



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : A61K 37/02, 39/395, 39/42, 39/21, 37/52, 47/48, G01N 33/569, C12N 5/10, A01K 67/027 // (A61K 39/395, 39/42) (A61K 39/395, 39/21)</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/28915 (43) Date de publication internationale: 22 décembre 1994 (22.12.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00662 (22) Date de dépôt international: 3 juin 1994 (03.06.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/06744 4 juin 1993 (04.06.93) FR 93/12656 22 octobre 1993 (22.10.93) FR</p>	<p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>
<p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue de Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HOVANESSIAN, Ara [FR/FR]; 124, avenue du Général-Leclerc, F-92540 Bourgl-la-Reine (FR). CALLEBAUT, Christian [FR/FR]; 2 bis, rue de Nice, F-75011 Paris (FR). KRUST, Bernard [FR/FR]; 7, rue de Madagascar, F-75012 Paris (FR). JACOTOT, Etienne [FR/FR]; 35, rue des Apennins, F-75017 Paris (FR). MARIE, Isabelle [FR/FR]; 216, avenue Aristide-Briand, F-92220 Bagneux (FR).</p>	<p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>
<p>(54) Title: HIV RETROVIRUS INFECTION INHIBITOR CAPABLE OF INTERACTING WITH CD26 RECEPTOR</p>	
<p>(54) Titre: INHIBITEURS DE L'INFECTION PAR UN RETROVIRUS HIV, CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LE RECEPTEUR CD26</p>	
<p>(57) Abstract</p>	
<p>Use of a compound to inhibit the entry of retroviral particles of an HIV-type human retrovirus, such as HIV-1 or HIV-2, in the target cells of an HIV retrovirus infected patient, which compound is capable of modifying the interaction between, on one hand, a CD26-type receptor present at the surface of the cells of a patient infected by said retrovirus, and on the other hand, the envelope glycoproteins of said HIV retrovirus. Recombinant cells capable of expressing human CD4 and CD26 receptors are also provided.</p>	
<p>(57) Abrégé</p>	
<p>L'invention concerne l'utilisation pour inhiber l'entrée de particules rétrovirales d'un rétrovirus humain de type HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, dans des cellules cibles d'un patient infecté par ce rétrovirus HIV, d'un composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par ce rétrovirus et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV. L'invention concerne également des cellules recombinantes, capables d'exprimer les récepteurs CD4 et CD26 humains.</p>	

BEST AVAILABLE COPY

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Inhibiteurs de l'infection par un rétrovirus HIV, capables d'interagir avec le récepteur CD26.

La présente demande concerne des moyens permettant l'identification et la préparation de nouveaux inhibiteurs de l'infection par un rétrovirus humain HIV. Elle concerne notamment des cellules et des organismes recombinants capables d'exprimer à la fois le récepteur humain CD4 et le récepteur humain CD26.

Le virus humain de l'immuno-déficience (HIV) est l'agent étiologique du syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA) et des troubles apparentés. Jusqu'à présent deux types distincts mais apparentés de rétrovirus, le type HIV-1 et le type HIV-2 ont été identifiés. L'infection des lymphocytes T CD4+, des monocytes et des macrophages par HIV, nécessite l'interaction des produits du gène env du virus avec le récepteur CD4 cellulaire (Klatzman D, et al. Nature 1984 ; 312:767-768).

Le gène env de HIV code pour une polyprotéine précurseur qui est clivée par une protéase cellulaire, conduisant à la production de glycoprotéines extracellulaires ou de surface (SU) et transmembranaires (TM) (Eiden LE, et al. Immunol. Today 1992 ; 13:201-206). La protéine de surface, par le biais d'interactions non covalentes avec la protéine transmembranaire est exposée à la surface des cellules infectées ou à la surface des particules virales.

Le récepteur CD4 est une glycoprotéine composée d'une région extracellulaire amino-terminale contenant quatre domaines apparentés à la famille des immunoglobulines et d'une région carboxy-terminale contenant les domaines transmembranaire et cytoplasmique (Eiden et al). Le premier domaine amino-terminal de la molécule CD4 apparaît être le site

principal de liaison des protéines de surface de HIV. En conséquence, cette liaison induit un changement de conformation du complexe SU-TM (complexe formé par les glycoprotéines de surface et transmembranaires) permettant l'interaction du domaine amino-terminal de la protéine transmembranaire avec la membrane cellulaire, causant ainsi la fusion des membranes virale et cellulaire (Marsh M, et al Immunol. Today 1988 ; 8:369-371) ; Eiden LE et al. Immunol. Today 1992 ; 13:201-206 ; Putney S. et al TIBS 1992 ; 17:191-196). Cependant avant la fusion, la protéine de surface pourrait subir une modification par clivage protéolytique, qui dans le cas de la protéine de surface de HIV-1 (GP120) semble avoir lieu au niveau du troisième domaine variable, communément appelé "boucle V3", c'est-à-dire le domaine principal de neutralisation (PND) (Moore JP, et al AIDS 1991 ; 5:S21-S33).

Différentes observations ont jusqu'à présent permis de penser que la boucle V3 joue un rôle critique dans l'infection par HIV-1 :

- 1) Des anticorps neutralisants produits naturellement chez des patients séropositifs pour HIV-1 sont principalement dirigés contre la boucle V3 (Goudsmit J, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988 ; 85:4478-4482),
- 2) Des anticorps monoclonaux spécifiques de la boucle V3 n'affectent pas la liaison de la gp120 au récepteur CD4 mais bloquent le processus de fusion (Kinney-Thomas E, et al. AIDS 1988 ; 2:25-29) ;
- 3) Des mutations dans la boucle V3 génèrent des virions dont le caractère infectieux est réduit (Grimaila RJ, et al. J. Virol. 1992 ; 66:1875-1883) ;
- 4) Des mutations dans la boucle V3 modifient le tropisme cellulaire (Chesebro B, et al. J. Virol. 1992 ; 66:6547-6554) et suscitent une modification dans le phénotype de HIV en tant que virus induisant un

syncytium ou n'induisant pas un syncytium (De Jong JJ, et al. J. Virol. 1992 ; 66:6777-6780).

La boucle V3 contient de 35 à 41, notamment environ 36 acides aminés dont les cystéines aux deux extrémités sont reliées, par un pont disulfure formant une boucle. La boucle V3 contient des résidus basiques conservés et en outre la séquence à proximité des cystéines liées, est similaire dans la plupart des isolats. (Clements GJ, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1991 ; 7:3-16). Par conséquent, il semble qu'il existe une pression de sélection pour conserver les séquences spécifiques dans la boucle V3. Les anticorps monoclonaux dirigés contre des peptides (15-mer) représentant le sommet ("crown") de la boucle V3 ont la capacité de neutraliser HIV-1 (Langedijk JPM, et al. J. Gen. Virol. 1991 ; 72:2519-2526), cela suggère que les résidus (acides aminés) du sommet de la boucle sont impliqués dans les interactions fonctionnelles de la boucle V3.

Jusqu'à présent aucune preuve directe n'a pu être établie concernant le fait que le clivage de la boucle V3 serait essentiel pour l'infection par HIV, bien que la gp120 purifiée ait pu être clivée en fragments de 50 et 70 kDa par différentes protéases : la trypsine et la tryptase clivent le site tryptique (GPGR ↓ AFVT), alors que la cathepsine E clive un site chymotrypsine-like (GPGRAF ↓ VT) (Clements GJ, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1991 ; 7:3-16).

Les inventeurs se sont intéressés à une séquence particulière de la boucle V3 de la glycoprotéine de surface de l'enveloppe du rétrovirus HIV-1, distincte de celles qui ont fait l'objet d'expérience dans l'art antérieur, et aux séquences correspondantes des rétrovirus HIV-2 et SIV. Ils ont observé qu'un très grand nombre d'isolats (plus de 90%) identifiés de HIV-1 présentent un motif peptidique constitué par la

séquence d'acides aminés Gly-Pro-Gly (Glycine - Proline - Glycine ou selon le code à une lettre GPG) et plus particulièrement un motif Gly-Pro, conservé. Ce motif GP ou GPG reste en outre inchangé in vivo pendant plusieurs années chez des individus infectés par HIV-1, alors que d'autres substitutions apparaissent dans la boucle V3 (Holmback et coll. J. Virol. 1993, 67:1612-1619).

De plus, l'ensemble des isolats identifiés de HIV-1, HIV-2 et SIV présentent à l'extrémité N-terminale de la boucle V3 un motif dipeptidique conservé RP (Arginine - Proline). Par ailleurs, pour HIV-2 et SIV, on trouve aussi un motif dipeptidique conservé RP (Arginine-Proline), KP (Lysine- Proline), EP (Acide glutamique-Proline) ou DP (Acide aspartique-Proline), à l'extrémité C-terminale de la boucle V3. Par ailleurs, pour HIV 2 et SIV, on trouve aussi un motif dipeptidique conservé RP (Arginine - Proline) ou KP (Lysine - Proline) à l'extrémité C-terminale de la boucle V3.

En dehors de la boucle V3, dans le cas de HIV-1, on trouve plusieurs motifs conservés, par exemple les séquences IPI (Isoleucine-Proline-Isoleucine), GPC (Glycine-Proline-Cystéine), PPG (Proline-Proline-Glycine), situés respectivement aux acides aminés 185 et 208, de SU et 411 de TM, par rapport à la séquence consensus de Myers et al (1992).

Les inventeurs ont recherché dans quelle mesure ces motifs peptidiques conservés pourraient être associés à l'infection par le rétrovirus HIV. Ils ont démontré que ces motifs conservés sont susceptibles de faire l'objet d'une interaction avec une molécule différente du récepteur CD4, présente sur des cellules infectables par le rétrovirus HIV, ou SIV.

Les inventeurs ont ainsi identifié un nouveau mécanisme intervenant dans l'infection par le

rétrovirus HIV ou SIV. Ils ont à cet égard mis en évidence une nouvelle étape de l'infection des cellules lymphoïdes (dont les cellules T) des patients contaminés par le rétrovirus HIV. Ils ont ainsi démontré qu'une étape nécessaire à l'entrée du rétrovirus dans les cellules (encore désignée fusion virus/cellule), fait intervenir une molécule différente du récepteur CD4. Cette étape peut en outre être impliquée dans la fusion cellulaire (fusion cellule/cellule) qui peut se produire après l'infection, pour donner lieu à la formation de syncytia. Conformément à ce nouveau mécanisme, un récepteur (DPPIV/CD26) présent à la surface des cellules sensibles à l'infection par le rétrovirus HIV ou SIV, est nécessaire à l'infection de ces cellules par le rétrovirus, en plus du récepteur CD4 déjà identifié comme étant une molécule requise pour l'infection des cellules par le rétrovirus.

Dans le cas de l'infection de cellules CD4<sup>+</sup>, par exemple les cellules neuronales SK-N-MC ( Xi Ling Li et coll J. Virol.1990, 64: 1383-1387) ou les cellules épithéliales (Fantini et al, PNAS, 1993, 90:2700-2704) les inventeurs ont identifié la présence de ce nouveau récepteur (DPPIV/CD26) qui devrait intervenir dans l'entrée du virus dans les cellules CD4<sup>+</sup>.

Les inventeurs ont maintenant démontré qu'une protéine cellulaire de surface interagit avec les glycoprotéines de l'enveloppe de HIV ou de SIV, en particulier au niveau de la boucle V3 et est susceptible de la cliver. Ce clivage aurait lieu en un site non identifié comme tel jusqu'à la présente invention. La protéine cellulaire de surface est la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) également appelée antigène ou récepteur CD26 (Barclay AN, et al. (1993). Facts book. London : Harcourt Brace Jovanich). La DPPIV est une protéase de surface cellulaire (EC 3.4.14.5)

qui possède en général une activité d'exopeptidase et dans certaines conditions une activité d'endopeptidase (Nagatsu T, et al. Anal. Biochem. 1976 ; 74:466-476 - Kudo M, et al J. Biochem. 1985 ; 97:1211-1218 - Kenny AJ, et al. Biochem. J. 1976 ; 155:169-182). Son activité enzymatique peut être testée par le clivage de dipeptides synthétiques couplés au substrat chromogène p-nitroanilide (para-nitroanilide), ces peptides ayant une séquence X-Pro-p-nitroanilide, pour produire un peptide X-Pro et de la p-nitroaniline (Nagatsu T, et al. Anal. Biochem 1976 ; 74:466-476) X pouvant être de préférence un résidu acide aminé Glycine (Gly), Alanine (Ala), Lysine (Lys), Arginine (Arg), Acide Glutamique (Glu) et Acide Aspartique (Asp).

L'antigène CD26 est largement exprimé sous la forme d'une glycoprotéine transmembranaire de 110 à 120 kDa, qui est identique à la sérine protéase de surface cellulaire appelée dipeptidyl peptidase IV. Cette enzyme qui est généralement considérée comme une exopeptidase, clive des dipeptides dans la partie amino-terminale de substrats polypeptidiques, dès lors que l'avant-dernier résidu est un résidu proline ; c'est-à-dire que cette enzyme permet le clivage de X-P-polypeptides, P étant un résidu Proline, lorsque X est un acide aminé N-terminal libre (Kudo M, et al. J. Biochem. 1985 ; 97:1211-1218). En outre, la DPPIV a été décrite comme capable de catalyser un clivage "endopeptidase-like", après un motif dipeptidique "GP-like" au sein de peptides synthétiques (Kenny AJ, et al. Biochem. J. 1976 ; 155:169-182) et de se fixer au collagène (Beauvois B, et al. I. Marcel Dekker (Eds.) New York, 1991). La DPPIV lie le collagène mais cette liaison n'affecte pas son activité enzymatique (Hanski C, et al. Exp. Cell Res. 1988 ; 178:64-72), suggérant ainsi l'existence de sites d'accrochage et catalytique dans différents domaines de DPPIV/CD26.



La DPPIV est une glycoprotéine comportant plusieurs chaînes oligosaccharidiques liées à des résidus N. La séquence hydrophobe près de l'extrémité amino-terminale (peptide signal) de cette ectoenzyme, fonctionne comme un domaine d'ancrage à la membrane, les 6 acides aminés N-terminaux formant un domaine cytoplasmique et l'extrémité carboxy-terminale de la protéine constituant le domaine extracellulaire (Ogata S, et al. J. Biol. Chem. 1989 ; 264:3596-3601 - Hong W, et al. J. Cell Biol. 1990 ; 111:323-328). Cette enzyme existe dans une grande variété de tissus y compris dans des organes lymphoïdes et non-lymphoïdes (Gorrel MD, et al. Cell. Immunol. 1991 ; 134:205-215). Elle est exprimée sur les membranes apicales de cellules épithéliales (bordures en brosse et surfaces canaliculaires), endothéliales, de certains lymphocytes T, des cellules folliculaires dendritiques et des macrophages (Gorrel MD, et al. Cell. Immunol. 1991 ; 134:205-215 - McCaughan et al. 1990 Hepatology 11, 547-558. - Sannes PL, et al. J. Histochem. Cytochem. 1983 ; 31:684-690). L'activité enzymatique a été détectée sur différentes lignées cellulaires humaines d'origine T et B, de même que sur des monocytes du sang périphérique (Beauvois B, et al. I. Marcel Dekker (Eds.) New York, 1991). L'expression de DPPIV/CD26 est faible dans les lymphocytes T au repos, mais elle augmente considérablement après leur activation; pour cette raison, DPPIV/CD26 est considéré comme un antigène d'activation des lymphocytes T.

On utilisera indifféremment les expressions DPPIV ou CD26 dans la suite du texte.

L'identification d'un nouveau mécanisme impliquant le récepteur CD26 comme médiateur de l'infection chez l'homme par un rétrovirus du SIDA, et plus particulièrement son implication dans l'entrée du rétrovirus dans les cellules telles que les lymphocytes

T, les monocytes et les macrophages, permet de définir de nouveaux moyens pour lutter contre l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV, et en particulier donne accès à de nouveaux inhibiteurs de l'infection des cellules par le rétrovirus.

Les inventeurs ont plus particulièrement montré que la DPPIV est un co-récepteur pour HIV, qui est susceptible de lier la boucle V3, et/ou d'autres régions dans les glycoprotéines de l'enveloppe virale SU et TM. Cette étape concernant l'interaction du complexe SU/TM avec DPPIV/CD26 est essentielle pour la pénétration de HIV dans les cellules T CD4.

L'invention a donc pour objet des composés capables de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV.

Elle a également pour objet le composé CD 26, ou un fragment de ce composé, capable de s'associer aux glycoprotéines d'enveloppe du HIV.

L'expression "glycoprotéines de l'enveloppe de HIV" n'est pas limitée à la forme glycosylée de la protéine. Au contraire elle comprend l'interaction ci-dessus définie à l'égard de la forme glycosylée et/ou des formes non glycosylées des glycoprotéines de l'enveloppe.

De même, l'expression "les glycoprotéines de l'enveloppe" signifie que l'interaction recherchée implique soit une seule de ces glycoprotéines SU ou TM, soit ces deux glycoprotéines individuellement ou un complexe formé par ces glycoprotéines, ou encore leurs formes non glycosylées.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'inhibiteurs structuraux ou fonctionnels du récepteur

CD26 pour inhiber l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV.

L'invention concerne aussi l'utilisation des composés et inhibiteurs ci-dessus définis, à titre de principe actif de compositions pharmaceutiques. Les composés et inhibiteurs de l'invention peuvent être utilisés pour inhiber l'entrée d'un rétrovirus HIV ou SIV dans les cellules cibles d'un hôte infecté et/ou pour inhiber la fusion cellulaire de cellules infectées par un rétrovirus HIV ou SIV, avec les cellules cibles d'un hôte infecté conduisant à la formation de syncytia et/ou pour inhiber la mort cellulaire par apoptose. De telles compositions sont notamment utilisables pour le traitement d'une infection par un rétrovirus HIV ou SIV. Elles peuvent aussi être mises en oeuvre pour la préparation de vaccins.

Entrent également dans le cadre de l'invention, des moyens pour le criblage de molécules capables de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV.

L'invention concerne donc l'utilisation d'un composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV.

Les composés selon l'invention ont la propriété d'inhiber l'entrée du virus HIV dans les cellules de l'hôte et/ou d'inhiber la formation de syncytia et/ou l'induction de l'apoptose.

L'inhibition de l'entrée du virus dans les cellules d'un patient infecté par un rétrovirus HIV

correspond à une inhibition de la fusion de la membrane cellulaire des cellules cibles de l'hôte avec la membrane virale.

L'inhibition de la formation des syncytia correspond à l'inhibition de la fusion de cellules infectées par le rétrovirus HIV, avec des cellules cibles.

L'invention permet également, selon un mode de réalisation préféré, l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose.

L'invention vise aussi une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif, le composé ci-dessus.

Par composition pharmaceutique, on entend l'association d'une part d'un ou plusieurs composés susceptibles d'avoir une action de traitement vis-à-vis d'un état pathogène ou de prévention d'un tel état, sur le corps humain ou animal, d'autre part de constituants permettant l'utilisation, l'administration et/ou la conservation de ce principe actif de façon telle qu'il puisse exercer son action.

Un composé ayant selon la définition donnée plus haut, la capacité de modifier, c'est à dire notamment d'altérer ou d'empêcher l'interaction structurale ou fonctionnelle entre le récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est de façon générale un inhibiteur structural ou fonctionnel du récepteur CD26.

Par "inhibiteur" du récepteur CD26, on entend une substance ou un groupe de substances capables d'altérer voire d'empêcher la reconnaissance par le récepteur CD26 des glycoprotéines de l'enveloppe d'un rétrovirus HIV, ou SIV, ou d'altérer ou d'empêcher la

liaison de ce récepteur avec cette glycoprotéine ou encore d'altérer ou de bloquer la fonction enzymatique du récepteur vis à vis de motifs peptidiques de type X-Pro, X étant un résidu d'acide aminé notamment choisi parmi les résidus Gly, Ala, Lys, Arg, Glu, ou Asp.

Un tel inhibiteur peut bloquer directement les sites du récepteur CD26 impliqués dans l'interaction avec les glycoprotéines de l'enveloppe de HIV ou de SIV et/ou le(s) site(s) donnant lieu à l'activité enzymatique du récepteur (site catalytique), par exemple en se fixant sur ces sites. Il peut également agir indirectement sur ces fonctions du récepteur par exemple par inhibition stérique des sites en cause.

L'invention a donc pour objet l'utilisation d'un composé capable de modifier l'interaction entre le récepteur CD26 et les glycoprotéines de l'enveloppe du rétrovirus HIV, le susdit composé ayant la propriété :

- d'inhiber la reconnaissance et/ou la liaison entre les glycoprotéines de l'enveloppe et le récepteur CD26, et/ou
- d'inhiber la capacité du récepteur CD26, à cliver une liaison peptidique après un motif du type X-P dans lequel X est un résidu d'un acide aminé choisi parmi les acides aminés Gly, Ala, Lys, Arg, Glu et Asp.

Sont notamment utilisables en tant qu'inhibiteurs de la fusion virus/cellule et/ou de la fusion cellule/cellule conduisant à la formation de syncytia, et/ou de l'apoptose cellulaire, des composés susceptibles d'inhiber l'infection due à un rétrovirus HIV ou SIV lesdits composés ayant la capacité de se substituer aux glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus HIV ou SIV dans l'interaction avec la molécule DPPIV/CD26, par exemple en constituant un substrat pour l'activité enzymatique DPPIV.

Une inhibition spécifique de l'activité DPPIV sur la surface des cellules conduit à une diminution de la

production d'interleukine-2 (IL-2) et d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) par des cellules mononucléées stimulées par du phorbol-ester et une réponse proliférative réduite à l'IL-2 de lymphocytes T mitogènes activés (Schön E, et al. Scand. J. Immunol. 1989 ; 29:127-132). Au vu de ces observations on a suggéré dans l'art antérieur que la DPPIV pourrait être impliquée dans l'induction et l'activation de cytokines qui contrôlent la prolifération lymphocytaire (Beauvois et al ; Schön).

La DPPIV est présente à la fois sur des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> quiescentes et son expression est accrue par l'activation des cellules T (Gorrel MD, et al. Cell. Immunol. 1991 ; 134:205-215). Des recherches sur des lymphocytes T humains ont montré que l'expression de DPPIV est associée avec celle du CDw29<sup>+</sup>, marqueur de cellules mémoires et avec l'activation induite par la stimulation de CD2 ou de CD3. Ces fonctions sont confirmées par la capacité d'anticorps anti-DPPIV, de moduler l'expression en surface de la DPPIV. Ces anticorps favorisent également l'augmentation de la réponse proliférative des cellules T traitées par des anticorps anti-CD3 ou anti-CD2, réponse qui est précédée par une augmentation de la mobilisation des ions Ca<sup>2+</sup>. La DPPIV est associée physiquement à une protéine connue CD45 liée à la membrane, de type tyrosine-phosphatase. (Torimoto Y, et al. J. Immunol. 1991 ; 147:2514-2517) (Alexander D, et al. Immunol. Today 1992 ; 13:477-481).

Ces observations suggèrent que la DPPIV joue un rôle dans la régulation de l'activation des cellules T humaines par le biais de son interaction avec le CD45, lui même connu pour intervenir dans l'activation lymphocytaire.

L'interaction des glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus HIV ou SIV avec DPPIV/CD26, pourrait modifier l'équilibre des signaux transduits lors de

l'activation lymphocytaire et entraîner la mort cellulaire par apoptose (Callebaut C. et Jacotot E., 1992 ; Mémoire de Maîtrise, Université Paris 11). En effet l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus HIV avec les lymphocytes initie une série d'événements conduisant à l'apoptose.

La capacité du composé utilisable dans le cadre de l'invention, à modifier l'interaction du récepteur CD26 vis-à-vis des glycoprotéines de l'enveloppe du rétrovirus HIV, peut être déterminée par le test comprenant les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une part de cellules comportant à leur surface le récepteur CD26, d'autre part d'une quantité égale à la TCID<sub>50</sub>, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV,
- l'incubation des susdites cellules et du rétrovirus HIV ou SIV à 37°C pendant un temps suffisant pour permettre la pénétration du rétrovirus dans les cellules, en présence d'une quantité déterminée du composé testé,
- le lavage des cellules pour éliminer les rétrovirus absorbés sur les cellules,
- l'élimination du virus extracellulaire et la quantification du virus intracellulaire,
- la centrifugation pour séparer les protéines rétrovirales, par exemple à 1000 g, et récupération du surnageant,
- la détection des protéines de HIV.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'étape de mise en contact du test défini ci-dessus, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2 ou d'un rétrovirus simien SIV, en une quantité égale à la TCID<sub>50</sub>, est réalisée avec des cellules comportant à leur surface, des récepteurs CD4 et des récepteurs CD26. De façon particulièrement

intéressante, ces récepteurs sont spécifiques d'espèce et de façon préférée sont les récepteurs CD4 et CD26 humains.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la capacité d'un composé approprié pour la mise en oeuvre de l'invention, de modifier l'interaction du récepteur CD26 vis-à-vis des glycoprotéines de l'enveloppe du rétrovirus HIV, peut être déterminée par le test comprenant les étapes suivantes :

- 1- la mise en contact d'une part de cellules comportant à leur surface les récepteurs CD26 et/ou CD4, d'autre part d'une quantité égale à la TCID50, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV,
- 2- l'incubation des susdites cellules et du rétrovirus HIV ou SIV à 37°C pendant un temps suffisant pour permettre la pénétration du rétrovirus dans les cellules, en présence d'une quantité déterminée du composé testé,
- 3- le lavage des cellules pour éliminer les rétrovirus absorbés sur les cellules,
- 4- le traitement des cellules pour éliminer les rétrovirus extracellulaires restants, par exemple par digestion contrôlée avec de la trypsine,
- 5- la préparation des extraits cytoplasmiques par traitement des cellules avec un tampon d'extraction, par exemple avec un tampon contenant 20 mM Tris-HCl, à pH 7,6, 0,15 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM PMSF, 100 unités/ml aprotinine et 0,5 % Triton X-100,
- 6- la centrifugation pour séparer les protéines rétrovirales, par exemple à 1000 g, et récupération du surnageant,
- 7- la détection et le cas échéant la mesure de la concentration de protéines du rétrovirus HIV ou SIV,



par exemple protéine du noyau (core), obtenue dans le surnageant, par exemple par un test ELISA.

Une alternative à ce test consiste à mettre en culture les cellules après l'étape de digestion contrôlée par la trypsine et à tester la production virale après 2 ou 3 jours. Ainsi, après l'étape 3, les cellules peuvent être incubées dans le milieu de culture et la production virale mesurée, par exemple après 3 ou 4 jours.

De façon préférée les cellules mises en oeuvre pour la réalisation de ces tests, expriment des récepteurs CD4 et CD26 spécifiques d'espèce, en particulier des molécules humaines, lorsqu'il s'agit de tester l'interaction du récepteur CD26 avec un rétrovirus HIV.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, est un inhibiteur peptidique ou non peptidique.

Le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est par exemple un anticorps dirigé contre le récepteur CD26 ou un épitope n'affectant pas l'activité catalytique de l'enzyme DPPIV.

Un tel anticorps est par exemple capable de former une liaison avec un épitope du récepteur CD26 de telle façon que l'interaction avec les glycoprotéines d'enveloppe de HIV ou de SIV est inhibée soit

directement, soit indirectement par exemple par empêchement stérique.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope du récepteur CD26 comprenant tout ou partie de la séquence GWSYG (Glycine-Tryptophane-Sérine-Tyrosine-Glycine) qui est le site catalytique potentiel de CD26 (Tanaka T et al J.Immunol., 1992, 149: 481-486).

Les inventeurs ont mis en évidence le fait que le site catalytique de CD26 peut impliquer trois séquences d'acides aminés de la séquence d'acides aminés de la molécule CD26, l'une étant l'enchaînement GWSYG les autres étant respectivement les enchaînements HGT et NNDI. Au sein de ces séquences, les inventeurs ont montré l'intérêt particulier des résidus S (sérine), H (histidine) et D (acide aspartique).

Un anticorps susceptible d'être utilisé pour la réalisation de l'invention est avantageusement tel que le complexe qu'il forme avec le récepteur CD26 altère ou neutralise l'activité catalytique du récepteur CD26.

A titre d'exemple d'un autre type de composé de l'invention, on citera les anticorps dirigés contre un épitope de la boucle V3 d'un rétrovirus HIV ou SIV contenant le motif Gly-Pro (GP) ou un motif GP-like tel qu'un motif Ala-Pro (AP), Lys-Pro (KP), Arg-Pro (RP), Glu-Pro (EP) ou Asp-Pro (DP).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un

rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est le tripeptide IPI ou le tripeptide KPR ou un peptide ayant dans sa structure, la conformation du tripeptide IPI ou du tripeptide KPR et notamment ayant dans sa structure un peptide ou un polypeptide contenant une séquence portant la fonction inhibitrice du peptide IPI et présentant éventuellement une symétrie au niveau de sa séquence d'acides aminés, le centre de symétrie de cette séquence étant de préférence constitué par un résidu Proline natif ou modifié.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, un composé intéressant contient un motif de reconnaissance contenu dans un substrat de l'enzyme DPPIV, ou un motif ayant une conformation suffisamment proche de celle du susdit motif de reconnaissance, pour être reconnue par l'enzyme DPPIV.

Un tel composé est capable de se comporter comme un substrat de l'enzyme DPPIV et donc d'occuper le site enzymatique de la molécule, empêchant la liaison entre la molécule DPPIV et les glycoprotéines d'enveloppe de HIV ou de SIV.

Ce composé capable de se substituer au substrat enzymatique de la DPPIV est de nature peptidique ou non peptidique. Il peut s'agir par exemple d'une molécule ayant la conformation tridimensionnelle du motif de reconnaissance normalement actif au niveau du substrat de la DPPIV.

Dans la suite du texte, l'expression "motif de reconnaissance contenu dans un substrat de l'enzyme DPPIV" sera parfois remplacée par l'expression "motif de reconnaissance du substrat de l'enzyme DPPIV".

Certains composés répondant à cette définition peuvent également être appropriés pour induire la

production d'anticorps neutralisants contre l'infection par HIV ou par SIV.

Un composé intéressant comprenant un motif de reconnaissance du substrat de la molécule DPPIV contient par exemple un motif peptidique choisi parmi les séquences GP, RP, KP DP ou EP, ou un motif choisi parmi les séquences GPG, RPG, KPG DPG ou EPG.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, ce motif de reconnaissance de substrat enzymatique est présenté dans un contexte structural analogue à l'environnement peptidique existant au niveau de la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe externe de HIV ou de SIV. A cet égard, notons par exemple que la présence du résidu glycine après le résidu proline contribue à la formation d'une structure de type coude  $\beta$  favorable à l'exposition de la proline. Selon une autre variante, le susdit motif est dans un environnement peptidique différent de celui existant au niveau de la boucle V3.

Des composés contenant le motif de reconnaissance du substrat, sont par exemple les peptides répondant à l'une des séquences GPGRAF, KRPGNK, RPGNK, KRPRQ ou EPGKN.

Ces peptides peuvent être isolés à partir des antigènes de HIV ou SIV ou synthétisés chimiquement. Les résidus d'acides aminés qu'ils contiennent peuvent être de configuration lévogyre ou dextrogyre. Avantageusement tous les résidus d'un même peptide sont de type lévogyre ou tous les résidus d'un même peptide sont de type dextrogyre.

Un tel composé conserve le cas échéant la capacité d'être clivé par l'action enzymatique de la DPPIV.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, une composition pharmaceutique est caractérisée en ce que le motif de reconnaissance est modifié de façon à

prévenir l'activité de clivage enzymatique normalement exercée par la DPPIV sur ce motif.

Une modification appropriée peut être réalisée au niveau de la liaison peptidique suivant et/ou précédant le résidu Proline du motif de reconnaissance, afin d'empêcher le clivage de cette liaison et donc afin de diminuer ou de supprimer la sensibilité aux peptidases.

Les techniques habituelles de modification des liaisons peptidiques peuvent être mises en oeuvre.

On citera notamment sans caractère limitatif les modifications de la liaison peptidique -CONH- conduisant à la formation d'une liaison réduite ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), rétro inverso ( $\text{NHCO}$ ), méthylène-oxy ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), thiométhylène ( $\text{CH}_2\text{-S}$ ), carba ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), cétométhylène ( $\text{CO-CH}_2$ ), hydroxyéthylène ( $\text{CHOH-CH}_2$ ), Aza ( $\text{N-N}$ ), E-alcène,  $\text{-CH=CH-}$  ou carba  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ .

L'invention a aussi pour objet les séquences de nucléotides codant pour les composés contenant le motif de reconnaissance du substrat de l'enzyme DPPIV. Ces séquences peuvent le cas échéant être administrées à un patient en vue de traiter ou de prévenir le SIDA; S'agissant des techniques d'administration, référence est faite à la publication de Wang et al (PNAS USA, vol 90 pp 4156-4160, Mai 1993) ou à la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 90/11092, le 4 Octobre 1990.

Ces composés décrits plus haut pour leur capacité à inhiber la fusion virus/cellule cible et/ou cellule/cellule et/ou l'apoptose cellulaire et ainsi à constituer des principes actifs de compositions pharmaceutiques, et en particulier les composés contenant un motif de type GP, RP, KP, EP, DP ou un motif tripeptidique de type GPG, RPG, KPG, EPG, DPG, ont la propriété tout à fait remarquable de pouvoir entrer dans la composition de vaccins contre

l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV bien que les séquences du motif de reconnaissance ne soient pas nécessairement accessibles sur la glycoprotéine gp120. Leur activité et notamment leur capacité à induire des anticorps contre les glycoprotéines d'enveloppe peut en effet se manifester quel que soit l'isolat du rétrovirus HIV (de type HIV1 ou HIV2 notamment) ou SIV en cause, puisque cette activité est définie à partir de séquences conservées entre différents isolats du rétrovirus HIV séquences étant en outre conservées au cours du temps chez un patient infecté par le virus.

Si besoin, le composé utilisable à titre de principe actif sera associé à une substance le protégeant in vivo contre l'action des protéases cellulaires, ou de façon générale à toute molécule porteuse ou système désigné par le terme complexe, favorisant ses propriétés par exemple de reconnaissance de sa cible ou ses propriétés antigéniques ou immunogènes.

Ainsi le composé utilisable pour la réalisation de l'invention et susceptible d'entrer dans la constitution de la composition pharmaceutique est avantageusement accompagné ou contenu dans une structure hétérologue, ou polymérisé de façon à favoriser son activité d'inhibition ou de prévention de l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV in vivo

A titre d'exemple, ce composé peut être inclus au sein d'une matrice synthétique de type peptidique, notamment pour former une structure de type MAP. De telles structures ont été décrites ainsi que leur mode de préparation dans la publication de Tam, JP (PNAS, USA, vol. 85, 5409-5413, Août 1988). L'inclusion du principe actif de médicament au sein de structures de type MAP a pour avantage de favoriser ses propriétés inhibitrices vis à vis de l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le composé décrit précédemment, lorsqu'il est de nature peptidique, est produit sous la forme d'une molécule recombinante, par exemple sous la forme d'une protéine de fusion, notamment avec un antigène de type HBsAg par exemple par insertion dans la séquence S ou pré-S de l'antigène. Les techniques de production des protéines de fusion sont bien connues de l'homme du métier et on fera par exemple référence à la publication de Delperoux et al (Science, vol. 233, pp. 472-475, 25 Juillet 1986).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est une forme soluble du récepteur CD26, notamment le récepteur CD26 dépourvu de sa séquence transmembranaire.

L'invention a également pour objet un procédé pour le criblage in vitro de composés capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, caractérisé en ce qu'il comprend le test comportant les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une part de cellules comportant à leur surface le récepteur CD26, d'autre part d'une quantité égale à la TCID50, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV,
- l'incubation des susdites cellules et du rétrovirus HIV ou SIV à 37°C pendant un temps suffisant pour

permettre la pénétration du rétrovirus dans les cellules, en présence d'une quantité déterminée du composé testé,

- le lavage des cellules pour éliminer les rétrovirus absorbés sur les cellules,
- l'élimination du virus extracellulaire et la quantification du virus intracellulaire,
- la centrifugation pour séparer les protéines rétrovirales, par exemple à 1000 g, et récupération du surnageant,
- la détection des protéines de HIV.

Selon un premier mode de réalisation de ce procédé, le criblage est effectué après avoir mis en contact le rétrovirus HIV ou SIV, avec des cellules comportant à leur surface, le récepteur CD4 et le récepteur CD26 et de façon préférée des récepteurs CD4 et CD26 spécifiques d'espèce, notamment des récepteurs humains.

De préférence, ce procédé comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une part de cellules comportant à leur surface les récepteurs CD26 et CD4, d'autre part d'une quantité égale à la TCID<sub>50</sub>, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV,
- l'incubation des susdites cellules et du rétrovirus HIV ou SIV à 37°C pendant un temps suffisant pour permettre la pénétration du rétrovirus dans les cellules, en présence d'une quantité déterminée du composé testé,
- le lavage des cellules pour éliminer les rétrovirus absorbés sur les cellules,
- le traitement des cellules pour éliminer les rétrovirus extracellulaires restants, par exemple par digestion contrôlée avec de la trypsine,



- la préparation des extraits cytoplasmiques par traitement des cellules avec un tampon d'extraction, par exemple avec un tampon contenant 20 mM Tris-HCl, à pH 7,6, 0,15 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM PMSF, 100 unités/ml aprotinine et 0,5 % Triton X-100,
- la centrifugation pour séparer les protéines rétrovirales, par exemple à 1000 g, et récupération du surnageant,
- la détection et le cas échéant la mesure de la concentration de protéine du core du rétrovirus HIV ou SIV, obtenue dans le surnageant, par exemple par un test ELISA.

Une alternative à ce test consiste à mettre en culture les cellules après l'étape de digestion contrôlée par la trypsine et à tester la production virale après 2 ou 3 jours.

Entrent également dans le cadre de l'invention, les composés susceptibles d'inhiber in vivo l'infection par un rétrovirus humain HIV, notamment un rétrovirus de type HIV-1 ou HIV-2, capables de modifier ou d'inhiber l'interaction entre d'une part, un récepteur du type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus HIV et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de HIV, ledit composé étant de nature peptidique ou non peptidique.

Des composés particulièrement avantageux sont par exemple:

- un anticorps dirigé contre le récepteur CD26, notamment un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope comprenant tout ou partie de la séquence GWSYG;
- un anticorps dirigé contre un épitope contenu dans le site formé par les séquences GWSYG, HGT, NNDI de la molécule CD26;
- un anticorps dirigé contre un épitope de la boucle V3 d'un rétrovirus HIV ou SIV contenant le motif Gly-Pro (GP) ou un motif GP-like tel qu'un motif Ala-

Pro (AP), Lys-Pro (KP), Arg-Pro (RP), Glu-Pro (EP) ou Asp-Pro (DP) ou un motif tripeptidique de type GPG, APG, KPG, RPG, EPG ou DPG ; un anticorps ayant ces propriétés, peut être un anticorps dirigé contre une des séquences données au tableau 9,

- un peptide ou un polypeptide ayant dans sa structure, la conformation du tripeptide IPI et notamment un peptide ou un polypeptide présentant une symétrie au niveau de sa séquence d'acides aminés, le centre de symétrie de cette séquence étant de préférence constitué par un résidu Proline natif ou modifié,

- un peptide, un polypeptide à l'exception des peptides KPR ou RPGFSPFR non modifiés, comprenant un motif de reconnaissance contenu dans le substrat de l'enzyme DPPIV par exemple un motif GP, KP, RP, EP ou DP ou un motif tripeptidique de type GPG, KPG, RPG, EPG, ou DPG, ou un analogue structural et/ou fonctionnel de ce peptide ou de ce polypeptide tel qu'une molécule non peptidique reproduisant la conformation tridimensionnelle essentielle de ce peptide ou de ce polypeptide telle qu'existant dans la boucle V3 des glycoprotéines externes d'enveloppe de HIV ou de SIV ou le cas échéant dans un autre environnement peptidique; a titre d'exemple on citera les peptides GPGRAF, KRPGNK, RPGNK, KRPRQ ou EPGKN ;

- un fragment de la molécule CD26, notamment sa forme soluble, par exemple un fragment contenant tout ou partie des séquences GWSYG, HGT et NNDI, ou un fragment contenant le site d'interaction avec les glycoprotéines d'enveloppe externes de HIV ou SIV ;

- une séquence de nucléotides codant pour un motif de reconnaissance de substrat enzymatique de la molécule DPP IV.

Ces composés peuvent être couplés à une molécule porteuse ou être associés à ou intégrés dans un

système, peptidique ou non, ayant la capacité de les protéger contre l'action des protéases in vivo.

Lorsqu'il s'agit de peptides ou de dérivés peptidiques, ils sont avantageusement modifiés pour diminuer, voire supprimer leur sensibilité aux protéases in vivo. De telles modifications ont été décrites dans les pages précédentes. Les composés ci-dessus peuvent aussi être associés à des substances telles que l'interleukine, à des adjuvants tels que Poly(A)-poly-(U) décrits par Hovanessian A et al (Immunology Today, vol 9, No. 6, 1988, pp. 161-162) et Krust et al.

En particulier, l'invention a pour objet l'utilisation d'un anticorps monoclonal 1F7 ou du peptide IPI ou d'inhibiteur ayant la même fonction inhibitrice vis-à-vis de HIV, de nature peptidique ou non peptidique, pour le traitement de cellules susceptibles d'être infectées par HIV ou SIV.

L'invention concerne aussi des compositions contenant plusieurs inhibiteurs d'une infection par un rétrovirus HIV ou SIV. De telles compositions peuvent contenir un mélange des composés selon l'invention avec des anti-viraux tels que l'AZT, le DDI, le DDC ou avec des anticorps notamment anti-peptidase ou anti-protéase ou tout anticorps ayant des propriétés de neutralisation vis-à-vis de HIV ou SIV.

A titre d'exemple entrent également dans le cadre de l'invention, des compositions contenant plusieurs types d'inhibiteurs de l'interaction entre CD26 et les glycoprotéines d'enveloppe externe de HIV ou de SIV, choisis parmi ceux qui ont été décrits ci-dessus.

Une telle composition peut contenir un anticorps anti-CD4 et un inhibiteur du récepteur CD26, selon ce qui a été décrit plus haut. Il peut s'agir aussi d'une composition contenant un anticorps ayant des propriétés de neutralisation vis-à-vis de HIV (anticorps anti-HIV)

ou de SIV et d'un anticorps anti-CD26 ou un inhibiteur du récepteur CD26.

Selon un aspect particulier de la réalisation de l'invention, les composés ou principes actifs peuvent être administrés au patient de façon à être libérés avec retard dans l'organisme ; ainsi ils peuvent être associés à du phosphate de calcium ou à de l'hydroxyde d'aluminium.

Peuvent encore être utilisées, pour préparer des inhibiteurs de l'interaction entre CD26/DPP IV et les glycoprotéines d'enveloppe de HIV ou de SIV, des molécules définies à partir de substrat de la molécule DPP IV tels que décrits par Fischer G et al (Pharmazie 38, 1983), Heinz J et al (biochemica et Biophysica Acta 954 (1988) 161-169), Brandt W et al (J. of Computer Aided Molecular Design 6, 1992, 159-174).

L'invention est également relative à l'utilisation des séquences polypeptidiques du tableau 9, pour préparer des anticorps ayant la capacité d'inhiber l'interaction entre d'une part un récepteur du type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain HIV, en particulier du type HIV-1 ou HIV-2, et d'autre part les glycoprotéines d'enveloppe de ce rétrovirus.

L'invention concerne en outre un anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre une séquence antigénique de HIV ou de SIV, capable de modifier, notamment d'inhiber l'interaction entre d'une part, un récepteur du type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain HIV, en particulier du type HIV-1 ou HIV-2, et d'autre part les glycoprotéines d'enveloppe de ce rétrovirus.

L'invention vise aussi des compositions pharmaceutiques ou des composés parmi ceux décrits ci-dessus, pour prévenir ou traiter l'apoptose cellulaire.

Entrent aussi dans le cadre de l'invention, des séquences de la région V3 des glycoprotéines d'enveloppe de HIV, caractérisées en ce qu'elles ont la capacité d'induire des anticorps par exemple idiotypiques capables d'interagir avec le récepteur CD26.

L'invention se rapporte également à une cellule recombinante, caractérisée en ce qu'elle est capable d'exprimer conjointement les récepteurs CD4 et CD26 humains.

Des cellules recombinantes intéressantes sont avantageusement des cellules eucaryotes et de préférence des cellules animales ou humaines par exemple les cellules humaines HeLa ou des cellules murines telles que les cellules NIH3T3.

Ces cellules peuvent être utilisées pour le criblage in vitro de substances susceptibles de se comporter comme inhibiteurs de l'interaction entre le récepteur CD26 et les glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus HIV ou SIV, par exemple dans le cadre des tests qui ont été décrits plus haut.

L'invention vise également un animal transgénique caractérisé en ce que ses cellules somatiques et/ou ses cellules germinales comprennent une séquence codant pour le récepteur CD4 humain et une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, dans des conditions permettant l'expression conjointe de ces deux récepteurs.

S'agissant de l'animal transgénique, l'invention exclut l'homme.

La transformation des seules cellules somatiques de l'animal permet d'obtenir l'expression des récepteurs CD4 et CD26 chez cet animal mais exclut la transmission à leur descendance. Au contraire la modification des cellules germinales permet la

transmission des gènes ou séquences codantes d'intérêt, dans les générations suivantes de l'animal.

Selon un mode de réalisation particulier, l'animal transgénique peut être obtenu par introduction dans les cellules de l'animal à un stade du développement précoce embryonnaire, par exemple ne dépassant pas 8 cellules, d'une séquence codant pour le récepteur CD4 humain et d'une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, dans des conditions permettant l'expression conjointe de ces deux récepteurs.

La modification des cellules par la séquence codante ou le gène codant pour les récepteurs CD4 et CD26 est avantageusement réalisée dans les premiers stades du développement embryonnaire et ce afin d'assurer chez l'animal développé la transformation de l'ensemble ou de la presque totalité de ces cellules.

Différentes techniques sont disponibles pour réaliser l'insertion d'un gène ou d'une séquence au niveau des cellules d'un embryon animal. On cite en particulier la publication de Brinster RL et al, PNAS, USA, vol. 82, pages 4438-4442, Juillet 1985.

Un animal intéressant dans le cadre de l'invention peut être l'animal résultant du développement de l'embryon que l'on a transformé pour y introduire les gènes ou les séquences d'intérêt. Il peut s'agir également d'un descendant d'un tel animal.

Des animaux transgéniques intéressants dans le cadre de l'invention sont par exemple des mammifères et en particulier des rongeurs tels que les souris. On pourra également avoir recours à des singes.

L'invention a pour objet également un procédé pour l'obtention d'un animal transgénique non humain comprenant dans ses cellules somatiques et/ou dans ses cellules germinales une séquence codant pour le récepteur CD4 humain et une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, dans des conditions permettant

l'expression conjointe de ces deux récepteurs comprenant les étapes de :

- l'introduction d'une séquence codant pour le récepteur CD4 humain, par exemple une séquence génomique ou une séquence d'ADNc, dans les cellules de l'animal, à un stade précoce du développement embryonnaire, par exemple ne dépassant pas 8 cellules,

- l'introduction dans un ature animal de la même espèce, d'une séquence codant pour le récepteur CD26 jumain, par exemple une séquence génomique ou une séquence d'ADNc, ladite séquence étant introduite dans les cellules de l'animal, à un stade précoce du développement embryonnaire, par exemple ne dépassant pas 8 cellules,

- le croisement des animaux résultant du développement des embryons ainsi modifiés, dans des conditions permettant l'obtention d'un animal transgénique exprimant conjointement dans ses cellules somatiques et/ou dans ses cellules germinales, les récepteurs humains CD4 et CD26.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et les figures qui suivent.

Ces figures ont la signification suivante :

Figure 1 - Le tripeptide IPI n'affecte pas la liaison de la gp120 aux cellules CEM.

Les cellules CEM ( $5.10^6$ ) ont été incubées (37°C, 1 heure avec la gp120 marquée avec  $^{125}\text{I}$  (50 ng ; 10 Ci/mg) en l'absence (lignes-) ou en présence de 20 mM IPI (ligne DipA) et des anticorps monoclonaux OKT4, OKT4A, 1F7, 110/4 et 71/10. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et les extraits cytoplasmiques ont été analysés par SDS PAGE. La gp120 recombinante était radioiodée avec le réactif de Bolton Hunter conformément à ce qui est décrit par Krust B. et al

dans AIDS Res. Hum. Retroviruses (1993 vol 9, 1081-1084). Un autoradiogramme est présenté.

Aucune internalisation apparente de la gp120 n'a eu lieu dans ces conditions expérimentales. Le traitement des cellules avec la trypsine a conduit à la perte de plus de 95% de gp120 marquée avec  $I^{125}$ , fixées aux cellules. La liaison de la gp120 aux cellules CEM était spécifique puisque l'anticorps OKT4A dirigé contre le site de liaison de la gp120 sur la molécule CD4 a complètement aboli la liaison.

Figure 2 - Activité peptidase DPPIV-like à la surface des cellules CD4 positives.

Des cellules CEM MOLT4 et U937 ( $5 \cdot 10^6$ ) dans un tampon peptidase (Hong W, et al. J. Cell Biol. 1990 ; 111:323-328) contenant soit 0,5 mM de GP-pNa (pour l'activité DPPIV peptidase) ou R-pNa (pour l'activité Arg-peptidase) ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes, 1, 2, 3 et 4 heures.

L'ordonnée donne les valeurs de la densité optique mesurée à 405 nm.

Figure 3 - Activité peptidase DPPIV-like à la surface de cellules humaines et murines CD4 négatives.

Les cellules humaines (HeLa et SK-N-MC) et murines (NIH/3T3) ont été testées pour rechercher l'activité peptidase DPPIV-like dans les conditions de la figure 2.

Figure 4 - Séquences consensus et séquences de différents isolats de la boucle V3 de HIV ou SIV.

Figure 5 - Co-culture de cellules H9/HIV-1 avec des cellules T murines exprimant d'une part CD4 humain, d'autre part CD4 et CD26 humains.



### Exemples

#### 1. Motifs dipeptidiques GP dans les boucles des isolats de HIV-1, HIV-2 et SIV présentent la spécificité requise pour la DPPIV.

La DPPIV manifeste une activité exopeptidase et une activité endopeptidase caractérisées par l'hydrolyse d'une liaison adjacente à un résidu proline avec une préférence spécifique pour les dipeptides GP-like et également pour les dipeptides AP, KP, RP, EP et DP (Nagatsu T, et al. Anal. Biochem. 1976 ; 74:466-476) ou tripeptides GPG, APG, KPG, RPG, EPG ou DPG . Le code à une lettre a été utilisé pour désigner les résidus d'acide aminé des peptides. Conformément à ce code, A représente l'alanine, P représente la proline, K représente la lysine, R représente l'arginine, E représente l'acide glutamique et D représente l'acide aspartique. L'enzyme purifiée manifeste des affinités légèrement différentes, dépendant du pH de la réaction (Nagatsu et al). Par exemple, l'activité relative de l'enzyme à des valeurs de pH égales à 7,0 et 8,7 vis-à-vis des peptides de type X-P-p-nitroanilide, de la plus élevée à la plus basse est la suivante :

pH 7,0 : K-P, G-P, R-P, A-P, E-P et D-P

pH 8,7 : G-P, A-P, K-P, R-P, E-P et D-P

De façon intéressante, le sommet ("crown") de la boucle V3 de HIV-1 contient le tripeptide GPG qui peut être clivé par l'action de la DPPIV. De plus, à l'extrémité N-terminale de la boucle V3, on trouve un motif dipeptidique RP qui est conservé chez tous les isolats HIV-1, HIV-2 et SIV testés. En outre, les isolats HIV-2 et SIV présentent des motifs dipeptidiques conservés RP ou KP à l'extrémité C-terminale de la boucle V3 (Tableau 1).

#### Conservation des motifs RP, KP et GPG

Les motifs dipeptidiques RP et KP aux extrémités N-et/ou C-terminales de la boucle V3 sont conservés dans

les isolats HIV-1, HIV-2 et SIV. A titre d'exemple, dans le cas de HIV-1, le motif GPG est conservé dans plus de 90 % des isolats de HIV-1 ; le motif GPG reste inchangé in vivo pendant plusieurs années chez un individu donné en dépit d'autres substitutions au niveau du sommet de la boucle V3 ; le motif GPG est fortement conservé parmi des patients HIV-1 séropositifs (Brown, AIDS 1991, 5: 535-542). Dans une étude menée par Holmback et al, (J. Virol. 1993, 67: 1612-1619) sur 30 patients hémophiles comportant un nombre de cellules CD4 supérieur ou égal à 100 cellules/mm<sup>3</sup>, 27 présentent un motif GPG et 3 ont une substitution conservative de type APG. On note que le motif AP-like vient juste après le motif GP, s'agissant de la spécificité vis-à-vis du substrat de DPPIV ; les substitutions du résidu proline du motif GPG pour former des motifs GAG ou GSG génèrent des virions dont le caractère infectieux est supprimé. De plus, de telles mutations n'affectent pas l'expression de l'enveloppe ou sa liaison au récepteur CD4, mais abolissent l'induction de syncytia ; des substitutions de GPG en APG, GQG GVG et GPF génèrent des produits d'enveloppe dont la capacité à induire des syncytia est significativement réduite (Grimalia et al, J. Virol. 1992 ; 66: 1875-1883); dans des cultures cellulaires in vitro, le motif GPG a été rapporté comme mutant en GQG lorsque l'infection HIV-1 est effectuée en présence d'un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre la boucle V3 (Masuda et al J. Immunol. 1990; 145: 3240-3246). Le peptide synthétique correspondant GQG V3 manifeste également une affinité réduite pour l'anticorps monoclonal.

Conservation du motif RP à l'extrémité N-terminale de la boucle V3 parmi les isolats HIV-1, HIV-2 et SIV : le motif RP/KP dans HIV-2 et SIV et le motif GP dans les isolats HIV-1 sont conservés dans plus de 90 % des

isolats, ce qui indique que ces motifs dipeptidiques dans la boucle V3 sont sous pression de sélection constante et sont essentiels pour le caractère infectieux du virus.

## 2. Procédures expérimentales pour la mesure de l'entrée des particules HIV dans des cellules.

Le stock d'isolats HIV1-LAI propagé sur une lignée cellulaire de lymphocytes T CD4 positifs (CEM), (Laurent AG, et al. J. Gen. Virol. 1990 ; 71:2273-2281) a été utilisé dans toutes les expériences décrites. La préparation du virus a été réalisée en milieu RPMI-1640 complété avec 10 % de sérum de veau foetal et 2µg/ml de Polybrène. L'internalisation des particules de HIV a été mesurée par une technique légèrement modifiée décrite précédemment (Harouse JM, et al. Science 1991 ; 253:320-323). Dans cette technique, l'entrée des particules HIV-1 dans ces cellules était suivie par la concentration intracellulaire en protéine principale du core (p25) après élimination du virus extracellulaire par traitement avec la trypsine. Brièvement des cellules CEM ( $5 \times 10^6$ ) ont été suspendues dans 1 ml de préparation de HIV-1 à une dose correspondant à la  $10^6$  TCID 50 par ml, conduisant à l'obtention de plus de 90 % de cellules produisant HIV aux jours 3 et 4 après l'infection (p.i. ou post-infection en anglais). La dose de suspension virale qui, lorsqu'elle est utilisée pour inoculer chaque culture d'un nombre donné de cultures tissulaires, entraîne des effets observables dans 50 % de ces cultures.

Après une heure d'incubation à 37° C, le virus restant adsorbé sur les cellules a été éliminé en lavant les cellules d'abord avec du PBS contenant 2mM de EDTA puis par un traitement avec la trypsine (2,5 mg/ml pendant 10 minutes à température ambiante). La digestion a été arrêtée par l'addition de 10 fois un milieu RPMI-1640 contenant 10 % (v/v) de sérum de veau

foetal. Des extraits cytoplasmiques ont été préparés par lyse des cellules dans un tampon d'extraction contenant 20 mM Tris-HCl, à pH 7,6, 0,15 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM PMSF, 100 unités/ml aprotinine et 0,5 % Triton X-100. Après centrifugation à 1000g, la concentration de p25 dans le surnageant a été mesurée par un test ELISA. Dans ces conditions expérimentales, aucune entrée significative de HIV ne s'est produite pendant la période d'incubation de 1 heure à 4° C. Ceci est normal puisque HIV peut lier les récepteurs CD4 à 4° C mais il ne peut pas pénétrer dans les cellules. Par ailleurs, à 37° C, une quantité considérable de HIV est entrée dans les cellules. Par exemple dans une des expériences, les concentrations de p25 intracellulaires à 4° C et 37° C ont été trouvées à une hauteur de 5<sup>1</sup>. Attention: L'imprimante ne dispose pas de la police DA\_MATH8a, remplacement par Courier -3 et 185 - 24 pg pour 10<sup>5</sup> cellules respectivement. On doit noter que seulement une très faible proportion des particules virales présentes est internalisée dans les cellules.

Ce test de détection de l'entrée de HIV dans les cellules CEM est hautement reproductible (Krust B, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1993 in press). En conséquence, il a été utilisé ici pour investiguer les différentes étapes impliquées dans le mécanisme de l'entrée de HIV dans les cellules.

### 3. Inhibition de l'entrée de HIV-1 dans des cellules CEM par des peptides correspondant à la boucle V3

Des peptides correspondant à la boucle V3 ont été décrits comme capables d'inhiber plus de 60 % de la formation des syncytia pendant l'infection par HIV-1 (Koito A, et al. Intern. Immunol. 1989 ; 1:613-618). Pour examiner l'effet de la boucle V3 sur la pénétration des particules HIV dans les cellules, différents peptides correspondant à différentes régions de la protéine de surface (gp120) de HIV-1 et de la

protéine transmembranaire (gp41) de HIV-1 ont été analysés. L'entrée de HIV dans des cellules T permissives de la lignée CEM a été testée. Les cellules préincubées pendant 15 à 30 min. avec les différents peptides, ont été incubées avec HIV-1LAI pendant une heure et le virus extracellulaire a été éliminé par un traitement à la trypsine selon les modalités décrites au point 2. Les résultats sont résumés dans le tableau 2 et montrent que les peptides de la boucle V3 inhibent 88 à 96 % de la pénétration des particules virales de HIV et que cet effet est spécifique puisque d'autres peptides dans la gp120 ne conduisent pas à un effet significatif. De plus, les peptides correspondant au sommet de la boucle V3 inhibent également l'entrée des particules HIV. De façon intéressante, le peptide gp41 qui contient des motifs GP- et RP-like dans sa séquence (voir tableau 2.bis) conduit à une inhibition de 46 % de l'entrée de HIV (tableau 2).

Dans le processus d'entrée de HIV, il a été rapporté que la boucle V3 n'est pas requise pour la liaison de gp120 au récepteur CD4 (Chiou SH, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1992 ; 8:1611-1618) et que le clivage de la boucle V3 pourrait être nécessaire pour le processus de fusion. L'effet d'inhibition potentielle des peptides V3 sur l'entrée de HIV dans des cellules (tableau 2), permet de penser que la boucle V3 interagit probablement avec un récepteur supplémentaire à la surface des cellules, qui peut également présenter une activité protéolytique spécifique. La liaison de la gp120 au récepteur CD4 peut entraîner des variations conformationnelles nécessaires pour démasquer ou/et modifier la conformation de la boucle V3, conformation optimale pour l'interaction avec DPPIV/CD26.

4. Des inhibiteurs spécifiques de DPPIV inhibent la pénétration des particules de HIV et abolissent l'infection par HIV.

Le tripeptide IPI (appelé également diprotine A) isolé à partir des filtrats d'une culture de Bacillus cereus est un inhibiteur spécifique de la DPPIV (Umezawa H et al J. Antibiot.; 1984; 37;422-425). L'effet de cet inhibiteur sur l'entrée de HIV, a été testé en même temps que celui d'autres peptides : VPL, GPA, GPGG, GGG, GP, KPR et RPGFSPFR (tableau 3). Les peptides ont été obtenus chez SIGMA sont purifiés par HPLC à 99 %. Le tripeptide IPI a conduit à l'obtention d'une inhibition supérieure à 90 % de l'entrée de HIV-1 dans les cellules. L'effet d'inhibition du tripeptide IPI était dépendant de la dose. De même les peptides KPR et RPGFSPFR ont conduit à une inhibition de l'entrée de HIV dans les cellules CEM, supérieure à 90 %. Aucun effet apparent n'a été observé avec les peptides VPL, GPA, GGG et GP. De façon intéressante, le peptide GPGG comportant le motif conservé GPG dans le sommet de la boucle V3 a exercé un effet d'inhibition significatif.

Lorsque l'infection par HIV-1 LAI des cellules CEM était réalisée en présence du peptide IPI (10 mM), aucune formation de syncytia n'était observée et la production de virus était inhibée à plus de 95 % (tableau 4).

Ces résultats démontrent que le tripeptide IPI est un inhibiteur spécifique de l'infection par HIV en prévenant l'entrée des particules virales dans les cellules.

La valeur de la concentration inhibitrice à 50 % de l'entrée de HIV dans les cellules a été obtenue en utilisant  $5.10^6$  cellules à différentes concentrations de chaque peptide testé.

5. Inhibition de la pénétration des particules de HIV par des anticorps monoclonaux spécifiques de la DPPIV

L'entrée des particules de HIV-1 LAI a été testée en présence de différents anticorps monoclonaux murins :

- l'anticorps monoclonal OKT4A (Ortho Diagnostics Systems) est dirigé contre le récepteur CD4 et reconnaît le site de liaison de la gp120 (Sattentau QJ, et al. Cell 1988 ; 52:631-633).
- l'anticorps monoclonal OKT4 (Ortho Diagnostics Systems) reconnaît un épitope proche du domaine transmembranaire du récepteur CD4. Cet anticorps a été décrit comme n'affectant pas la liaison de la gp120 au récepteur CD4 (Sattentau et al).
- l'anticorps monoclonal 110/4 (Genetic Systems, Seattle) est dirigé contre la boucle V3 et il neutralise complètement l'infection par HIV-1. Cet anticorps monoclonal a été décrit comme n'affectant pas la liaison de la gp120 au récepteur CD4 (Kinney-Thomas E, et al. AIDS 1988 ; 2:25-29).
- l'anticorps BA5 est dirigé contre la DPPIV a été obtenu de la Société Immunotech à Marseille - France.
- l'anticorps monoclonal 1F7 spécifique du DPPIV a été décrit dans la publication de Torimoto C (J. Immunol. 1989 ; 143:3430-3439).
- l'anticorps monoclonal ALB1 est dirigé contre l'antigène CALLA CD10 (Immunotech Marseille) qui est une endopeptidase neutre associée à la membrane cellulaire (Barclay AN, et al. Facts Book. London:Harcourt Brace Jovanitch).
- l'anticorps CD11a (Immunotech) est dirigé contre la chaîne alpha de l'antigène-1 fonctionnel sur les lymphocytes (LFA-1) qui est un membre du groupe de la famille des molécules d'adhésion (Pardi R, et al. Immunol. Today 1992 ; 13:224-230).

- l'anticorps monoclonal CD18 (Immunotech) est dirigé contre la chaîne  $\beta$  du LFA-1.

Le Tableau 5 donne le résultat de ces expériences. Les anticorps monoclonaux OKT4A et 110/4 ont conduit à une inhibition de 85 à 93 % de l'entrée de HIV-1 dans les cellules. L'anticorps monoclonal OKT4 a conduit à une inhibition de 47 % et cette inhibition pouvait être due à un effet indirect sur la liaison de la gp120 au récepteur CD4 (voir figure 1). L'anticorps BA5 a inhibé l'entrée de HIV à un niveau supérieur à 60 % alors que l'anticorps 1F7 a conduit à une inhibition de 84 %. Les anticorps monoclonaux ALB1, CD11a, et CD18 n'avaient aucun effet significatif sur l'entrée de HIV.

Ces résultats démontrent que les anticorps spécifiques dirigés contre la DPPIV ont la capacité de bloquer l'entrée de HIV et l'infection. Ceci a ensuite été confirmé par l'inhibition de 90 % de la production du virus lorsque l'infection était réalisée en présence de l'anticorps 1F7.

Les anticorps monoclonaux spécifiques de l'endopeptidase neutre CD10, de la tyrosine phosphatase CD45 et des antigènes CD18 et CD11a des lymphocytes n'affectent pas l'entrée de HIV.

6. Le tripeptide IPI inhibe l'entrée de HIV à une étape suivant la liaison de la gp120 au récepteur CD4

Pour étudier le mécanisme par lequel le tripeptide IPI inhibe l'entrée du virus, on a étudié la liaison aux cellules CEM de la gp120 marquée avec  $^{125}\text{I}$ , en l'absence ou en présence de IPI et des anticorps monoclonaux OKT4, OKT4A, 1F7 et 110/4. L'anticorps monoclonal 71/10 dirigé contre une protéine kinase associée aux ribosomes (PKR) (Meurs EF, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993 ; 90:232-236) a été utilisé comme contrôle (figure 1). Dans ces conditions expérimentales, l'addition d'anticorps OKT4A a permis d'abolir complètement la liaison de la gp120 marquée



aux cellules CEM indiquant ainsi que la liaison était spécifique. L'anticorps OKT4 a conduit à une inhibition d'environ 40 % en accord avec la faible inhibition par cet anticorps présentée au tableau 5 de l'entrée de HIV. L'anticorps 110/4 contre la boucle V3 qui a été décrit comme n'affectant pas la liaison, a permis d'abolir complètement la liaison entre le CD26 et la gp120. De façon intéressante, le tripeptide IPI qui inhibe plus de 90 % de l'entrée de HIV dans des cellules CEM (tableau 3) n'affectait pas du tout la liaison de la gp120 à ces mêmes cellules (figure 1). Ce dernier résultat indique que l'effet inhibiteur du IPI sur l'entrée de HIV est un effet suivant l'évènement de liaison entre la gp120 et le récepteur CD4, probablement dû à une interaction de la boucle V3 avec un composant de type DPPIV/CD26 à la surface de la cellule. L'observation que l'entrée de HIV était également inhibée par l'anticorps IF7 (tableau 5) concorde avec l'hypothèse émise par les inventeurs que le composant à la surface de la cellule est bien la DPPIV.

L'anticorps IF7 a permis d'obtenir une inhibition de plus de 50 % de la liaison de la gp120 aux cellules CEM (figure 1), et dans d'autres expériences de plus de 80%. Cet effet résulte probablement d'interférences indirectes induites par cet anticorps monoclonal comme c'est le cas avec le l'anticorps 110/4.

#### 7. Le tripeptide IPI inhibe l'activité DPPIV sur la surface des cellules CEM

La présence d'une activité peptidase DPP IV-like sur des cellules CEM intactes a été examinée en utilisant le substrat chromogène Gly-Pro-p-nitroanilide (GP-pNA) comme décrit dans la publication Beauvois B, (Beauvois B, et al. Eur. J. Immunol. 1992 ; 22:923-930). L'activité DPPIV constatée par la production de pNA comme une conséquence du clivage de

GP-pNA était inhibée de façon significative par le tripeptide IPI alors que l'anticorps monoclonal IF7 ne l'affectait pas (tableau 6). Comme le tripeptide IPI et l'anticorps IF7 inhibent l'entrée de HIV dans des cellules CEM (tableau 3), ces agents pourraient donc interférer avec l'entrée de HIV selon différents mécanismes : IPI inhiberait l'activité peptidase de DPPIV alors que l'anticorps IF7 bloquerait un site différent de DPPIV. Ainsi, deux domaines apparaissent fondamentaux dans la DPPIV, s'agissant de l'implication de la DPPIV dans le mécanisme de l'entrée de HIV dans des cellules CEM. Il faut noter que IPI pourrait également agir pour l'inhibition de fixation des glycoprotéines de l'enveloppe de HIV à CD26.

La dose inhibitrice de 50 % de la concentration a également été calculée pour mesurer l'inhibition de l'activité DPPIV. Les résultats sont rapportés au tableau 6. La valeur  $IC_{50}$  pour chaque peptide, a été calculée en utilisant  $5.10^6$  cellules à différentes concentrations de chaque peptide, avec le substrat GP-pNA. De façon intéressante, les peptides qui inhibaient l'entrée de HIV, inhibaient également le clivage du substrat GP-pNA.

Ces résultats ont démontré la spécificité de ces inhibiteurs peptidiques et ont confirmé le rôle de CD26 dans sa fonction peptidase, dans le procédé d'entrée de HIV dans les cellules.

Les tripeptides IPI et KPK ont inhibé l'entrée de HIV dans d'autres cellules telles que les cellules lymphoblastoïdes MOLT4, Jurkat et les cellules monocytoides U397 ainsi que dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> fraîchement isolés et activés par la PHA, à des concentrations comparables à celles observées pour les cellules CEM.

8. Inhibition de l'infection par HIV-2 par le tripeptide IPI et l'anticorps monoclonal MAb1F7 spécifique pour la DPPIV

Les régions de la glycoprotéine de surface de HIV-2 et SIV qui correspondent à la boucle V3 de la gp120 de HIV-1 ne sont pas bien définies (Moore JP, et al. AIDS 1991 ; 17:191-196). Les peptides de la boucle V3 de HIV-2 peuvent être utilisés pour obtenir des anticorps faiblement neutralisants (Björling E, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991 ; 88:6082-6086), alors que la région V3 de SIV semble ne pas jouer de rôle dans la neutralisation. Ainsi les régions V3 de HIV-2 et SIV ne sont pas des épitopes potentiellement neutralisants comme ceux des isolats de HIV-1.

Les régions V3 de HIV-2 et SIV ne contiennent pas le tripeptide consensus GPG au sommet de la boucle. En revanche, tous les isolats HIV-2 et SIV contiennent des dipeptides conservés, RP près de l'extrémité N-terminale et RP ou KP près de l'extrémité C-terminale de leur région V3 respective (Clements GJ, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1991 ; 7:3-16). Etant donné que de tels dipeptides peuvent également être des substrats pour l'activité peptidase DPPIV-like (Nagatsu T, et al. Anal. Biochem. 1976 ; 74:466-476), la DPPIV pourrait donc être impliquée dans l'entrée de HIV-2 et de SIV dans les lymphocytes T CD4. Pour vérifier si la DPPIV est impliquée dans l'entrée de HIV-2, un isolat HIV-2 EHO, hautement divergent et cytopathogène parmi les différents isolats de HIV-2, a été utilisé. Les cellules CEM ont été infectées en l'absence ou en présence d'inhibiteurs spécifiques de la DPPIV, tels que le tripeptide IPI et l'anticorps monoclonal 1F7 (tableau 7). Après 1 heure d'infection, pour permettre l'entrée des particules de HIV-2, les cellules ont été soumises à un traitement par la trypsine pour éliminer le virus extracellulaire et ont été cultivées pour

tester la production de virus. Le peptide IPI et l'anticorps 1F7 ont conduit à l'obtention d'une inhibition supérieure à 75 % (78 % et 82% respectivement) de la production de virus alors que les contrôles correspondants (VPL GGG et l'anticorps ALB1) ne produisaient pas d'effet apparent (tableau 7). En dehors de l'inhibition de la production de virus, les cultures de HIV-2 EHO n'ont pas développé d'effet cytopathogène lorsqu'elles étaient traitées avec IPI ou l'anticorps 1F7.

9. L'infection par HIV est inhibée de façon spécifique par le tripeptide IPI

Des inhibiteurs d'endopeptidases et d'exopeptidases avec des spécificités variées ont été utilisés pour rechercher leur effet sur l'infection par HIV-1 (Tableau 8). Des inhibiteurs connus d'endopeptidases ou d'exopeptidases tels que l'aprotinine, la leupeptine, l'antipaine, la pepstatine et la bestatine n'avaient pas d'effet sur l'entrée de HIV dans les cellules et sur l'activité DPPIV-like. Aucun de ces inhibiteurs n'a donc produit d'inhibition significative de l'infection par HIV. Dans les mêmes conditions expérimentales, le tripeptide IPI conduisait à 90 % d'inhibition.

10. Activité DPPIV à la surface de différents types de cellules

Des dérivés du para-nitroanilide (pNA) tels que GP-pNA et RP-pNA ont été utilisés pour tester la présence potentielle d'une peptidase DPP IV et d'une Arg-peptidase à la surface des lignées cellulaires humaines positives pour le récepteur CD4 : CEM, MOLT4 et U937 (figure 2). L'activité peptidase DPP IV-like a été retrouvée sur chacune des 3 lignées cellulaires mais à différents niveaux, les cellules MOLT4 donnant lieu à des niveaux plusieurs fois supérieurs à ceux observés avec les cellules CEM et U937. Cette

différence est spécifique puisque le niveau de l'activité Arg-peptidase était comparable entre ces trois lignées cellulaires. Par conséquent les cellules MOLT4 pourraient être plus susceptibles à l'infection par HIV en accord avec différentes observations indiquant un accroissement de l'effet cytopathogène de HIV dans des cellules MOLT4 comparé à l'effet observé dans des cellules CEM et U937.

On a aussi étudié la variation de l'activité enzymatique DPPIV selon qu'elle se manifeste au niveau de cellules humaines ou de cellules murines.

La concentration inhibitrice à 50% ( $IC_{50}$ ) d'IPI a été mesurée en utilisant des extraits de cellules humaines (HeLa) et murines (NIH 3T3) et le GP-pNA comme substrat.

L'activité peptidase DPPIV-like a été mesurée soit à la surface de cellules intactes ( $5 \times 10^6$ ) ou en utilisant des extraits cellulaires (25  $\mu$ l) dans un volume total de réaction égal à 0,5 ml dans un tampon peptidase contenant 100 mM Hepes pH 7,6, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $MgSO_4$ , 8 mM glucose, 1 % BSA et soit 0,5 mM GP-pNA ou RP-pNA. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 2 à 4 heures et la réaction a été arrêtée par l'addition de 1M acétate de sodium pH 4,5 (1 ml). Après centrifugation à 12000 g pendant 5 min., la production de pNA dans le surnageant a été mesurée par adsorption à 405 nm. Pour la préparation des extraits cellulaires de façon à suivre l'activité DPPIV, les cellules lysées dans un tampon E (75  $\mu$ l/ $10^7$  cellules) ont été conservées à 4°C pendant 10 min. avant centrifugation à 12000 g pendant 10 min. Le surnageant dilué avec un volume de tampon BI a ensuite été centrifugé une fois supplémentaire à 12000 g pendant 10 min. et le surnageant a été conservé à - 80°C. Le tampon E contient 20 mM Tris HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl,

5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM PMSF, 100 unités/ml aprotinine et 0.5 % Triton X-100.

Le tampon BI contient 20 mM Tris-HCl, 400 NaCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 100 unités/ml aprotinine 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 % Triton X-100 et 20 % glycérol.

11. Le mécanisme d'inhibition de l'entrée de HIV par les peptides IPI et KPR est un évènement postérieur à la liaison.

Pour déterminer le mécanisme par lequel les inhibiteurs peptidiques inhibent l'entrée du virus dans les cellules, la liaison de la gp120 marquée avec  $^{125}I$  à des cellules CEM en présence de différents anticorps monoclonaux et de différents inhibiteurs peptidiques a été étudiée (figure 4). L'anticorps monoclonal OKT4A a aboli complètement la liaison de la gp120 marquée avec  $^{125}I$  aux cellules CEM, indiquant que la liaison était spécifique. Au contraire, l'anticorps monoclonal OKT4 a inhibé seulement partiellement la liaison, ce qui était en accord avec l'observation de la faible inhibition de l'entrée de HIV par cet anticorps. L'anticorps monoclonal MAb 110/4 spécifique de la boucle V3 et qui présentait un titre neutralisant très fort (Goudsmit et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4478-4482, 1988 ; De Jong et al, J. Virol. 66, 6777-6780, 1992 ; Chesebro et al., J. Virol. 66, 6547-6554, 1992 ; Linsley et al., J. Virol. 62, 3695-3702, 1988) a aboli la liaison ; ce résultat illustre le rôle critique que la boucle V3 joue dans l'entrée de HIV dans les cellules. Une inhibition partielle de la liaison de la gp120 a été observée avec l'anticorps monoclonal 1F7, suggérant que le récepteur CD26 est localisé au voisinage de la molécule CD4. Les inhibiteurs peptidiques et KPR n'avaient pas d'effet apparent sur la liaison, indiquant que leur action inhibitrice de l'entrée du

virus dans les cellules est un événement postérieur à la liaison du virus à la cellule, probablement dû à l'interaction de la boucle V3 avec un composant de surface cellulaire manifestant une activité enzymatique DPP IV-like. L'observation que l'entrée de HIV était également inhibitée par l'anticorps monoclonal contre CD26, a montré que ce composant à la surface de la cellule, nécessaire à l'entrée du virus, est la molécule CD26.

12. L'infection de cellules murines avec HIV nécessite l'expression des molécules CD4 et CD26 humaines.

Des études préalables ont indiqué que le composant supplémentaire à la surface des cellules, dont la présence est nécessaire pour l'entrée de HIV, est comme la molécule CD4, spécifique d'espèce. Ainsi l'expression de l'ADNc de CD4 humain transfecté dans des cellules humaines et murines, rend les cellules humaines sensibles à l'infection par HIV, au contraire des cellules murines transfectées. Bien que les particules de HIV se lient à la fois aux cellules humaines et murines exprimant la molécule de CD4 humaine, l'entrée du virus a lieu uniquement dans les cellules humaines (Maddon et al, Cell, 47, 333-348 (1986); Ashorn, Berger, Moss, J. Virol 64, 2149-2156 (1990); Clapham, Blanc, Weiss, Virology 181, 703-715 (1991)).

Dans une étude comparative, les inventeurs ont montré que l'activité petpidase DPPIV-like à la surface des lignées cellulaires humaines CD4<sup>+</sup> et murines CD4<sup>+</sup> était présente. Cependant ces activités petpidases sur les cellules murines (telles que NIH 3T3 et L929) étaient résistantes à l'inhibition par le peptide IPI. Dans d'autres études utilisant les extraits de cellules humaines (HeLa) et murines (NIH 3T3), les inventeurs ont démontré que l'enzyme murine est significativement

moins sensible à l'inhibition par le peptide IPI que l'enzyme humaine (tableau 10). Par exemple, la concentration inhibitrice ( $IC_{50}$ ) de IPI était au moins 100 fois supérieure pour l'activité DPPIV-like murine comparée à l'activité DPPIV-like humaine testée sur les substrats GP-pNA ou RP-pNA. L'activité d'une autre peptidase telle que l'arginine-peptidase (Bauvois, Sanceau, Wietzerbin, Eur. J. Immunol. 22, 923-930, 1992) était à un niveau similaire lorsque l'enzyme était d'origine humaine ou murine et était relativement insensible à l'activité du peptide IPI. Ces résultats ont confirmé que l'effet inhibiteur du peptide IPI est spécifique de l'activité peptidase DPPIV-like d'origine humaine. Les différentes valeurs  $IC_{50}$  obtenues avec le peptide IPI, nécessaires pour l'inhibition de l'activité de la DPP IV de cellules humaines et murines a permis de formuler l'hypothèse que les différences dans la séquence de CD26 entre ces espèces étaient responsables de l'incapacité de HIV à infecter les cellules murines exprimant la molécule CD4 humaine. L'incapacité du CD26 murin à servir de corécepteur au récepteur CD4 humain a été démontrée par les expériences dont les résultats sont donnés au tableau 11. Les cellules NIH 3T3 ont été transfectées avec des vecteurs plasmidiques exprimant le récepteur CD4 humain et le récepteur CD26 humain soit individuellement, soit ensemble. Les cellules transfectées ont ensuite été mises en contact avec HIV-1 LAI et la production de virus a été mesurée par infection des cellules CEM. Aucune production significative de virus par les cellules exprimant le récepteur CD26 humain seul ou le récepteur CD4 humain seul n'a été détectée. Au contraire les cellules exprimant à la fois les récepteurs CD4 et CD26 humains ont produit des virus infectieux. L'addition d'inhibiteurs de l'entrée de HIV dans les cellules tels que le tripeptide IPI et



l'héparine (Krust et al, 1993, AIDS Res. Hum Retroviruses vol. 9, pp. 1081-1084) pendant la mise en contact de HIV avec les cellules transfectées exprimant à la fois CD4 et CD26 a conduit à une inhibition complète de l'infection par HIV. L'action inhibitrice de IPI et de l'héparine illustre la spécificité de l'infection virale dans les cellules transfectées. Avant tout ces résultats confirment que CD26 est essentiel pour l'entrée de HIV dans les cellules exprimant CD4.

En utilisant d'autres inhibiteurs peptidiques spécifiques et un anticorps monoclonal spécifique (Mab 1F7), les inventeurs ont ici clairement démontré le rôle de CD26 dans le mécanisme de l'entrée de HIV dans les cellules. Les effets inhibiteurs similaires obtenus avec différents inhibiteurs contre des variants non apparentés de HIV tels que HIV-1 LAI et HIV-2 EHO indiquaient que la nécessité de la présence de CD26 est un phénomène général pour différents isolats de HIV-1 et de HIV-2. L'observation que les inhibiteurs peptidiques bloquaient l'entrée de HIV sans affecter la liaison de la glycoprotéine SU au récepteur CD4, suggérait que la molécule CD4 sert uniquement comme un site d'attachement efficace du virus sur la surface cellulaire qui permet ensuite l'interaction entre la boucle V3 et le récepteur CD26. La liaison de la glycoprotéine SU du virion à la molécule CD4 peut induire des modifications conformationnelles rendant la boucle V3 plus accessible. On a observé que la liaison de l'anticorps monoclonal spécifique de la boucle V3 à la glycoprotéine de surface de HIV-1 (gp120) était augmentée par la présence du récepteur soluble CD4 (McKeating, Cordell, Dean, Balfe, Virology 191, 732-742, 1992). On a montré dans la présente invention que l'entrée de HIV-1 était bloquée de façon significative à la fois par l'anticorps monoclonal MAb

1F7 et les tripeptides IPI/KPR alors que l'activité peptidase DPP IV était inhibée uniquement par les tripeptides en question. L'anticorps MAb 1F7 n'avait pas d'effet apparent sur l'activité DPP IV (Tanaka et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4586-4590, 1993). Par ailleurs les mêmes tripeptides n'affectaient pas la liaison, alors que l'anticorps monoclonal MAb 1F7 exerçait un effet d'inhibition partielle. Ces deux types d'inhibiteurs peuvent donc interférer avec le processus d'entrée de HIV-1 dans les cellules, par deux mécanismes indépendants : IPI/KPR inhibent le site catalytique impliqué dans l'activité DPP IV alors que l'anticorps MAb 1F7 affecte le site de reconnaissance de la gp120 par le récepteur CD26.

Matériel et méthode correspondant aux tests rapportés au tableau 11

Les cellules NIH 3T3 ont été transfectées avec des vecteurs plasmidiques exprimant les récepteurs CD4 et CD26, soit indépendamment, soit ensemble, par la technique de coprécipitation au phosphate de calcium. Selon cette technique, les cellules NIH 3T3 ( $1,2 \cdot 10^6$ ) ont été étalées dans des flacons plats de  $25 \text{ cm}^2$  et transfectées trois jours plus tard. Le milieu de culture (Dulbecco) a été remplacé avec du milieu frais et après une heure,  $10 \mu\text{g}$  de chaque plasmide (pLXN exprimant le récepteur humain CD4 ; pKG5 exprimant le récepteur CD26) seul ou mélangé avec l'autre plasmide a été précipité avec les cellules par la technique de coprécipitation au phosphate de calcium. Après 48 heures, les cellules transfectées ont été lavées avec le milieu contenant 2mM EDTA suivi par un autre lavage avec le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec HIV1 LAI (correspondant à  $0,5 \mu\text{g}$  de p25) pendant 6 heures en l'absence ou en présence des inhibiteurs de l'entrée de HIV (IPI, héparine). Les cellules ont d'abord été lavées dans un milieu

contenant 2mM EDTA puis trypsinisées pour éliminer le virus extra-cellulaire. Les cellules ont été ensuite réétalées dans des flacons plats de 75 cm<sup>2</sup> avec un milieu de culture frais et incubées à 37°C pendant 24 heures. 1 ml de partie aliquotée de chaque surnageant a ensuite été utilisé pour infecter des cellules CEM (5 10<sup>6</sup>). La production de HIV1 (p25, ELISA) dans les cultures de cellules CEM a été mesurée 7 et 11 jours plus tard dans le surnageant. Le plasmide exprimant CD4 a été décrit par Maddon PJ et al (Cell 47:333-348). Le plasmide pKG5-CD26 a été décrit par Fleischer B. et al, Cellul Immunol. 146, 249-260, (1993).

Les résultats présentés ici montrent la nécessité de la présence de CD26 pour l'entrée de HIV dans les cellules et le fait que des cellules produisant HIV dans des cultures in vitro sont condamnées à mourir. Le complexe SU-TM de l'enveloppe de HIV joue un rôle clé pour l'entrée des particules virales dans les cellules et lorsqu'il est exprimé au niveau de la membrane des cellules infectées, il est responsable de l'initiation du phénomène d'apoptose par interaction avec au moins la molécule CD4.

L'implication de CD26 dans l'entrée virale et dans l'infection a pu être illustrée indirectement par plusieurs études antérieures. In vitro dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> frais, l'entrée virale n'a lieu qu'après activation cellulaire, processus associé à une augmentation d'expression de l'antigène de surface CD26. Par ailleurs, des observations chez les individus infectés par le VIH ont montré in vivo une diminution sélective des cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant CD26 (De Pasquale A. et al Acta Haemat. 81, 19-21 (1989) ; Valle-Blazquez M. et al, J. Immunol. 149, 3073-3077 (1992) ; Vanham G. et al, J. AIDS 6, 749-757 (1993)). De telles observations corroborent nos résultats démontrant ainsi, la nécessité de CD26 pour l'entrée

virale et le fait que les cultures cellulaires infectées soient condamnées à mourir.

Le complexe gp120/gp41 de l'enveloppe du VIH joue un rôle clé dans l'entrée des particules, et lorsque ce complexe est exprimé à la surface des cellules infectées, il est responsable de l'initiation de l'apoptose par l'interaction avec la molécule CD4 (Terai C. et al, New Concepts in AIDS pathogenesis L. Montagnier, ML. Gougeon Eds. 1993, pp. 41-58). Par analogie avec le mécanisme d'entrée du VIH décrit ici et les précédentes observations indiquant que CD26 est impliqué dans la transduction des signaux d'activation cellulaire (Haffer D.A. et al 1989, J. Immunol. 142, 2590-2596) CD26 est impliqué dans le mécanisme d'induction de l'apoptose par le complexe gp120/gp41.

Le développement du SIDA chez des individus seropositifs pour HIV est corrélé avec la charge en virus dans le sang et dans les tissus lymphoïdes. Les médicaments disponibles actuellement pour traiter le SIDA ne permettent pas d'éradiquer le génome de HIV des cellules infectées. La démonstration que CD26 est requis pour l'entrée virale offre les moyens de développer de nouveaux inhibiteurs de l'infection virale. L'inhibition de l'entrée de HIV-1 et HIV-2 par les tripeptides IPI et KPR donne la possibilité de développer des inhibiteurs simples mais spécifiques qui pourraient bloquer la fonction de CD26 et être par conséquent utilisés effectivement comme agents thérapeutiques pour les patients atteints de SIDA.

#### Construction de lignées

Dans une lignée de lymphocytes T de souris exprimant CD4 humain (U. Blank et al., Eur. J. Immunol. 23, 3057, 1993), les inventeurs ont démontré qu'après transfection des cellules par un plasmide exprimant

CD26 humain, HIV-1 entre dans ces cellules. L'addition de l'AZT au cours de l'infection des cellules T murines exprimant CD4 et CD26 humains est bloquée par l'AZT. Bien que les cellules soient infectées, la production de virus est très faible à cause des restrictions au niveau de la transactivation du LTR de HIV. De plus, le fonctionnement des transactivateurs de TAT et REV dans ces cellules non humaines a été décrit être bloqué en raison de leur interaction avec certaines protéines qui peuvent être spécifiques d'espèce.

En utilisant la lignée des cellules T murines exprimant CD4 humain et transfectées avec un plasmide exprimant CD26 humain, des clones de ces cellules de souris exprimant CD4 et CD26 humains ont été obtenus. A cause de la restriction de la réplication du HIV dans les cellules de souris, les clones ont été utilisés dans un test pour évaluer leur capacité à fusionner avec des cellules H9 chroniquement infectées par HIV-1 (H9/HIV-1). Ces dernières cellules exprimant les glycoprotéines d'enveloppe du virus pourraient être utilisées comme des cellules effectrices pour interagir avec des cellules CD4<sup>+</sup> et initier la fusion des membranes cellulaires, formant ainsi des cellules multinucléées ou syncytia. La formation de syncytia (c'est à dire fusion cellule/cellule) comme l'entrée du HIV (c'est à dire, fusion virus/cellule) nécessite le récepteur CD4 et aussi un autre composant cellulaire de surface qui est suggéré être spécifique de l'espèce.

La photo (figure 5) montre plusieurs images de co-culture de cellules H9/HIV-1 avec des cellules T murines exprimant d'une part CD4 humain et d'autre part CD4 et CD26 ensemble après 24 h de commencement de co-culture. Pour faciliter le fusionnement, l'agrégation des cellules a été obtenue par l'addition de Wheat Germ Agglutinin (WGE : 10 µg/ml). Sur cette figure 5, les cellules de souris exprimant CD4, et CD26 humains

fusionnent avec les cellules H9-HIV en formant des syncytia et des ballonnements qui sont les deux caractéristiques typiques de l'effet cytopathogène observé dans les cellules humaines infectées par le virus HIV. La formation de syncytia et de ballonnements n'est pas observée dans les co-cultures avec les cellules de souris exprimant seulement CD4 humain. Ces observations peuvent être utilisées comme preuve supplémentaire pour le rôle de l'antigène CD26 dans le mécanisme de fusionnement initié par l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe de HIV avec le récepteur CD4.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation pour inhiber l'entrée de particules rétrovirales d'un rétrovirus humain de type HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, dans des cellules cibles d'un patient infecté par ce rétrovirus HIV, d'un composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par ce rétrovirus et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV.
2. Utilisation d'un composé selon la revendication 1, pour inhiber la formation de syncytia chez un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV.
3. Utilisation d'un composé selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour inhiber l'induction de l'apoptose cellulaire chez un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, modifie l'interaction entre le récepteur CD26 et la séquence peptidique dite "boucle V3" de la glycoprotéine d'enveloppe externe d'un rétrovirus HIV.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre le récepteur CD26 et les glycoprotéines de l'enveloppe du rétrovirus HIV, a la propriété
  - d'inhiber la reconnaissance et/ou la liaison entre les glycoprotéines de l'enveloppe et le récepteur CD26, et/ou

- d'inhiber la capacité du récepteur CD26, à cliver une liaison peptidique après un motif du type X-P dans lequel X est préférentiellement un résidu d'un acide aminé choisi parmi les acides aminés Gly, Ala, Lys, Arg, Glu et Asp.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la capacité du composé à modifier l'interaction du récepteur CD26 vis-à-vis des glycoprotéines de l'enveloppe du rétrovirus HIV, est déterminée par le test comprenant les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une part de cellules comportant à leur surface le récepteur CD26, d'autre part d'une quantité égale à la TCID50, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV,
- l'incubation des susdites cellules et du rétrovirus HIV ou SIV à 37°C pendant un temps suffisant pour permettre la pénétration du rétrovirus dans les cellules, en présence d'une quantité déterminée du composé testé,
- le lavage des cellules pour éliminer les rétrovirus absorbés sur les cellules,
- l'élimination du virus extracellulaire et la quantification du virus intracellulaire,
- la centrifugation pour séparer les protéines rétrovirales, par exemple à 1000 g, et récupération du surnageant,
- la détection des protéines de HIV.

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le test comporte l'élimination du virus extracellulaire et la quantification du virus intracellulaire par :

- traitement des cellules pour éliminer les rétrovirus extracellulaires restants, par exemple par digestion contrôlée avec de la trypsine,



- le cas échéant, la mise en culture de cellules pendant deux ou trois jours,
- préparation des extraits cytoplasmiques par traitement des cellules avec un tampon d'extraction, par exemple avec un tampon contenant 20 mM Tris-HCl, à pH 7,6, 0,15 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM PMSF, 100 unités/ml aprotinine et 0,5 % Triton X-100,
- et le cas échéant la mesure de la concentration de protéine du noyau (core) du rétrovirus HIV ou SIV, obtenue dans le surnageant, par exemple par un test ELISA.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que l'étape de mise en contact d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV, en une quantité égale à la TCID 50 est réalisée avec des cellules comportant à leur surface, des récepteurs CD4 et CD26.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, est un inhibiteur de nature peptidique ou de nature non peptidique.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est capable de modifier l'interaction entre le récepteur CD26 et la glycoprotéine d'enveloppe de surface.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est un anticorps dirigé contre le récepteur CD26.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope du récepteur CD26 comprenant tout ou partie de la séquence GWSYG.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope du récepteur CD26 tel que le complexe anticorps-CD26 formé, neutralise l'activité catalytique du récepteur CD26, ou un épitope qui n'affecte pas l'activité catalytique.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain

de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est un anticorps dirigé contre un épitope de la boucle V3 d'un rétrovirus HIV ou SIV contenant le motif Gly-Pro (GP) ou un motif du type GP tel qu'un motif Ala-Pro (AP), Lys-Pro (KP), Arg-Pro (RP), Glu-Pro (EP) ou Asp-Pro (DP).

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est le tripeptide IPI ou le tripeptide KPR ou un peptide ayant dans sa structure la conformation du tripeptide IPI ou du tripeptide KPR et portant la fonction inhibitrice du peptide IPI et notamment un peptide ou un polypeptide ayant dans sa structure un peptide présentant une symétrie au niveau de sa séquence d'acides aminés, le centre de symétrie de cette séquence étant de préférence constitué par un résidu Proline natif ou modifié.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est un peptide ou un polypeptide contenant la séquence portant la fonction inhibitrice du peptide IPI et présentant éventuellement une symétrie au niveau de sa séquence d'acides aminés, le centre de symétrie de cette séquence étant de préférence constitué par un résidu Proline, ledit peptide ou polypeptide étant couplé à une molécule

porteuse ayant la capacité de protéger le peptide contre l'action des protéases in vivo.

17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV est une forme soluble du récepteur CD26, notamment en ce qu'il s'agit du récepteur CD26 dépourvu de sa séquence transmembranaire.

18. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, contient un motif de reconnaissance contenu dans un substrat de l'enzyme DPPIV, ou un motif ayant une conformation suffisamment proche de celle du susdit motif de reconnaissance, pour être reconnue par l'enzyme DPPIV et former avec elle un complexe de type enzyme-substrat.

19. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, un composé contenant un motif de reconnaissance choisi parmi les motifs GP, RP, KP, EP ou DP, ou parmi les motifs GPG, RPG, KPG, EPG ou DPG, les susdits motifs étant soit dans le contexte structural de l'environnement peptidique de la boucle V3 des glycoprotéines d'enveloppe de HIV ou SIV, soit dans un autre contexte.

20. Utilisation selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce que le motif de reconnaissance est

modifié de façon à le préserver in vivo des activités peptidases et notamment à prévenir l'activité de clivage enzymatique normalement exercée par la DPPIV sur ce motif.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que la modification du motif de reconnaissance correspond à une modification de la liaison peptidique précédant ou suivant le résidu Proline de sorte que cette liaison est résistante au clivage par la DPPIV.

22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que le composé capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, est associé à une structure hétérologue ou polymérisé de façon à favoriser son activité d'inhibition ou de prévention de l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV in vivo.

23. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que le principe actif est inclu au sein d'une matrice synthétique de type peptidique, notamment pour former une structure de type MAP.

24. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que le composé constituant le principe actif est sous forme polymérisée.

25. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le composé constituant le principe actif est sous la forme d'une molécule recombinante, par exemple sous la forme d'une protéine de fusion avec un antigène tel que HBsAg.

26. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 25, caractérisée en ce que le principe actif est un peptide contenant une séquence choisie parmi GPGRAF, KRPGNK, RPGNK, KRPRQ ou EPGKN.

27. Procédé pour le criblage in vitro de composés capable de modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, caractérisé en ce qu'il comprend le test comportant les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une part de cellules comportant à leur surface le récepteur CD26, d'autre part d'une quantité égale à la TCID<sub>50</sub>, d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV,
- l'incubation des susdites cellules et du rétrovirus HIV ou SIV à 37°C pendant un temps suffisant pour permettre la pénétration du rétrovirus dans les cellules, en présence d'une quantité déterminée du composé testé,
- le lavage des cellules pour éliminer les rétrovirus absorbés sur les cellules,
- l'élimination du virus extracellulaire et la quantification du virus intracellulaire,
- la centrifugation pour séparer les protéines rétrovirales, par exemple à 1000 g, et récupération du surnageant,
- la détection des protéines de HIV.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'étape de mise en contact d'un rétrovirus humain HIV, notamment HIV-1 ou HIV-2, ou d'un rétrovirus simien SIV, en une quantité égale à la TCID<sub>50</sub>, est réalisée avec des cellules comportant à leur surface, des récepteurs CD4 et CD26.

29. Procédé pour le criblage in vitro de composés capable de modifier l'activité catalytique d'un récepteur de type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain de type

HIV, en particulier de type HIV-1 ou HIV-2 vis à vis de les glycoprotéines de l'enveloppe de ce rétrovirus HIV, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- la mise en contact de cellules portant le récepteur CD26 à leur surface, par exemple des cellules CEM, avec un rétrovirus humain HIV-1 ou HIV-2, ou un rétrovirus simien SIV, avec une quantité déterminée d'un composé testé dont on a préalablement vérifié la capacité à cliver un motif X-P dans une séquence X-Pro-p-nitroanilide dans laquelle X est un résidu d'un acide aminé choisi préférentiellement parmi les acides aminés Gly, Ala, Lys, Arg, Glu et Asp, ou un composé ayant une fonction similaire
- l'incubation des cellules à 37°C pendant un temps suffisant et dans des conditions permettant la réaction catalytique entre le récepteur CD26 et la glycoprotéine d'enveloppe de surface du rétrovirus HIV ou SIV,
- la centrifugation des cellules,
- la détermination de la présence et la cas échéant de la concentration en protéine du rétrovirus HIV ou SIV, obtenue dans le surnageant, par exemple par un test ELISA.

30. Composé susceptible d'inhiber in vivo l'infection par un rétrovirus humain HIV, notamment un rétrovirus de type HIV-1 ou HIV-2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un composé capable de modifier ou d'inhiber l'interaction entre d'une part, un récepteur du type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus HIV et d'autre part, les glycoprotéines de l'enveloppe de HIV, ledit composé étant

- soit un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope comprenant tout ou partie de la séquence GWSYG
- soit un anticorps dirigé contre un épitope de la boucle V3 et/ou d'autres domaines des glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus HIV ou SIV contenant le

motif Gly-Pro-Gly (GPG) ou Ile-Pro-Ile (IPI) ou un motif du type GP tel qu'un motif Ala-Pro (AP), Lys-Pro (KP), Arg-Pro (RP), Glu-Pro (EP) ou Asp-Pro (DP),

- soit un peptide ayant dans sa structure la conformation du tripeptide IPI et notamment un peptide présentant une symétrie au niveau de sa séquence d'acides aminés, le centre de symétrie de cette séquence étant de préférence constitué par un résidu Proline natif ou modifié,

- soit un composé contenant un motif de reconnaissance contenu dans un substrat de l'enzyme DPPIV, ou un motif ayant une conformation suffisamment proche de celle du susdit motif de reconnaissance, pour être reconnue par l'enzyme DPPIV et former avec elle un complexe de type enzyme-substrat.

31. Composé selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il est couplé à une molécule porteuse ayant la capacité de le protéger contre l'action des protéases in vivo.

32. Utilisation de l'anticorps monoclonal 1F7 pour modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur du type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain HIV, en particulier du type HIV-1 ou HIV-2, et d'autre part les glycoprotéines d'enveloppe de ce rétrovirus.

33. Utilisation de peptides de type IPI ou de molécules ayant la même fonction inhibitrice vis à vis de HIV ou SIV, de nature peptidique ou non peptidique, pour modifier l'interaction entre d'une part, un récepteur du type CD26 présent à la surface de cellules d'un patient infecté par un rétrovirus humain HIV, en particulier du type HIV-1 ou HIV-2, et d'autre part les glycoprotéines d'enveloppe de ce rétrovirus.

34. Composition comprenant un anticorps anti-CD4 et un inhibiteur du récepteur CD26 selon l'une quelconque des revendications 30 ou 31.



35. Composé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le motif de reconnaissance répond à la définition donnée dans l'une quelconque des revendications 19 à 26.
36. Composé selon l'une quelconque des revendications 30 ou 35, caractérisé en ce qu'il est soit associé à une structure hétérologue par exemple pour former une structure de type MAP ou une protéine recombinante, soit polymérisé.
37. Cellule recombinante, caractérisée en ce qu'elle est capable d'exprimer conjointement les récepteurs CD4 et CD26 humains.
38. Cellule recombinante selon la revendication 37, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote, notamment d'une cellule humaine, par exemple une cellule HeLa ou d'une cellule murine, par exemple une cellule NIH 3T3.
39. Animal transgénique caractérisé en ce que ses cellules somatiques et/ou ses cellules germinales comprennent une séquence codant pour le récepteur CD4 humain et une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, dans des conditions permettant l'expression conjointe de ces deux récepteurs.
40. Animal selon la revendication 39 tel qu'obtenu par introduction dans les cellules de l'animal à un stade du développement précoce embryonnaire, par exemple ne dépassant pas 8 cellules, d'une séquence codant pour le récepteur CD4 humain et d'une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, dans des conditions permettant l'expression conjointe de ces deux récepteurs.
41. Animal transgénique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un descendant d'un animal transgénique selon la revendication 39 ou la revendication 40.
42. Animal transgénique selon l'une quelconque des revendications 39 à 41, caractérisé en ce qu'il s'agit

d'un mammifère, par exemple d'un rongeur par exemple une souris ou d'un singe.

43. Procédé pour l'obtention d'un animal transgénique comprenant dans ses cellules somatiques et/ou dans ses cellules germinales une séquence codant pour le récepteur CD4 humain et une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, dans des conditions permettant l'expression conjointe de ces deux récepteurs comprenant les étapes de :

- l'introduction d'une séquence codant pour le récepteur CD4 humain, par exemple une séquence génomique ou une séquence d'ADNc, dans les cellules de l'animal, à un stade précoce du développement embryonnaire, par exemple ne dépassant pas 8 cellules,

- l'introduction dans un autre animal de la même espèce, d'une séquence codant pour le récepteur CD26 humain, par exemple une séquence génomique ou une séquence d'ADNc, ladite séquence étant introduite dans les cellules de l'animal, à un stade précoce du développement embryonnaire, par exemple ne dépassant pas 8 cellules,

- le croisement des animaux résultant du développement des embryons ainsi modifiés, dans des conditions permettant l'obtention d'un animal transgénique exprimant conjointement dans ses cellules somatiques et/ou dans ses cellules germinales, les récepteurs humains CD4 et CD26.

44. Vaccin pour la protection contre une infection par un rétrovirus HIV ou SIV, caractérisé en ce qu'il comprend le principe actif tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 26 ou le composé selon la revendication 30, dans des conditions permettant la production d'anticorps neutralisants contre l'infection par HIV ou SIV.

1 / 5

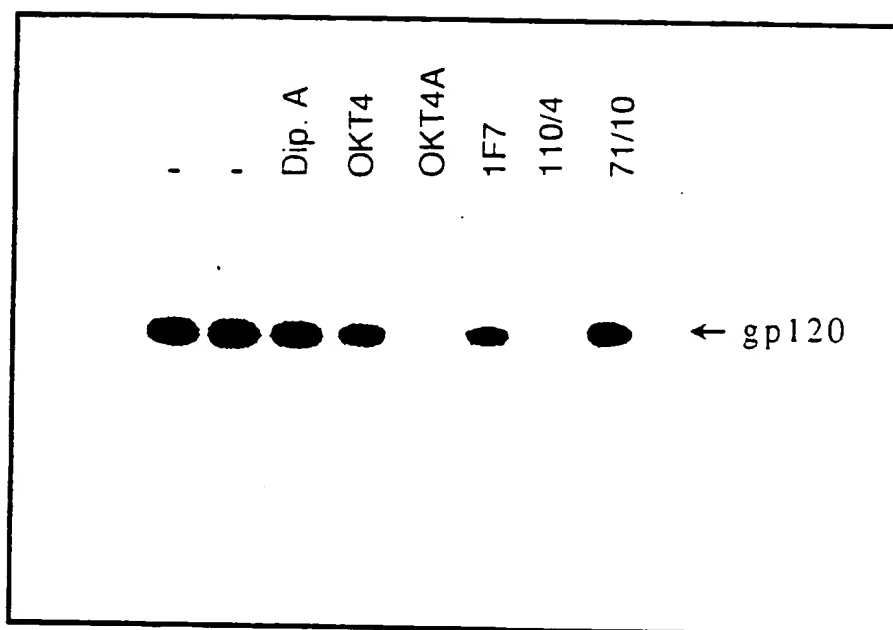


FIGURE 1

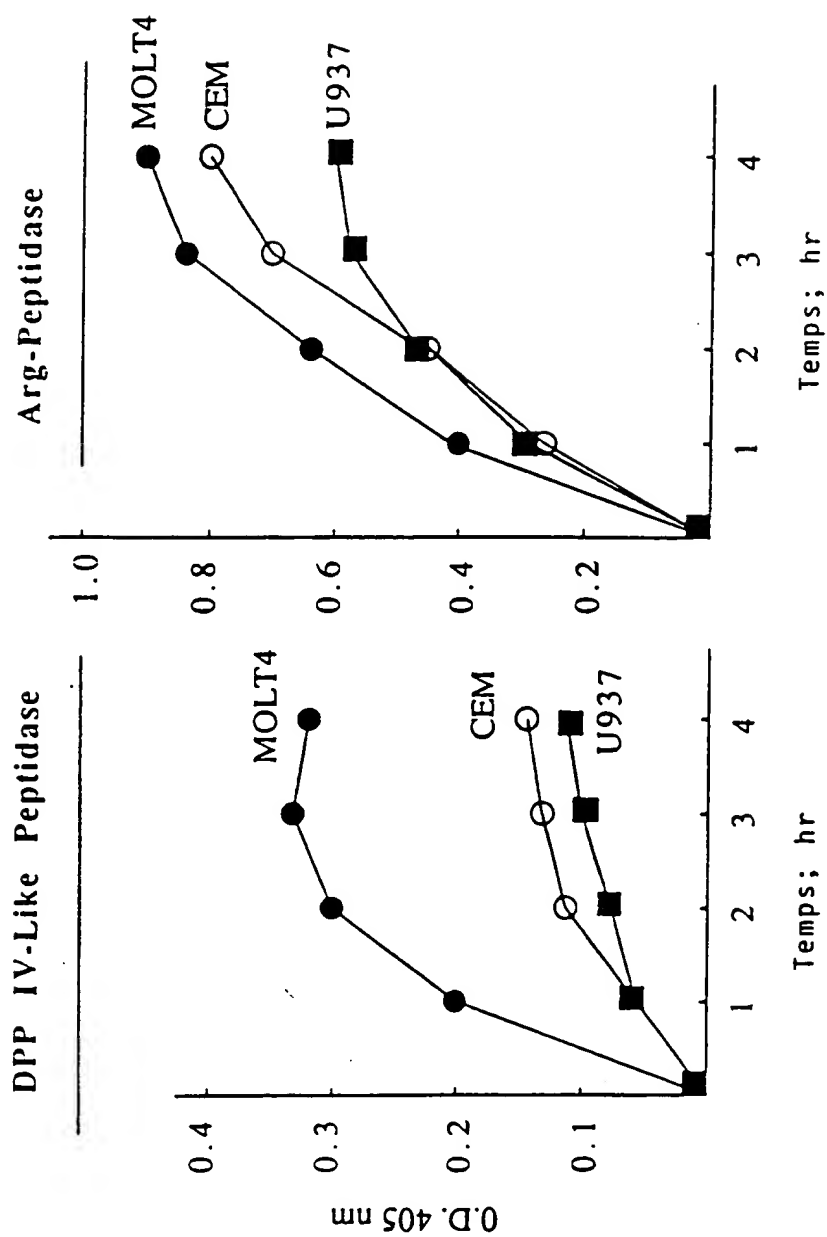


FIGURE 2 A

FIGURE 2 B

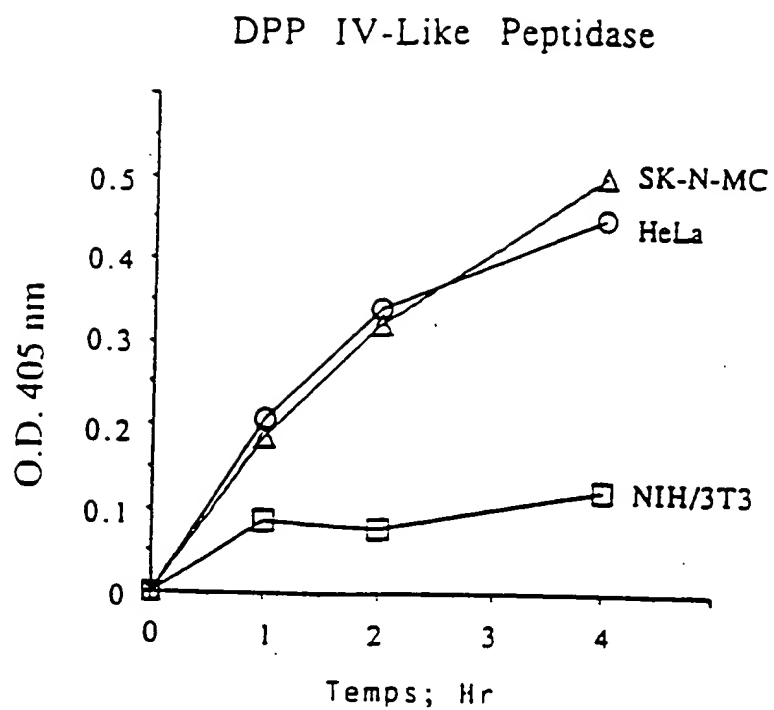


Figure 3

FIGURE 4

Coculture of H9/HIV-1 cells with Murine T cells/Hu-CD4

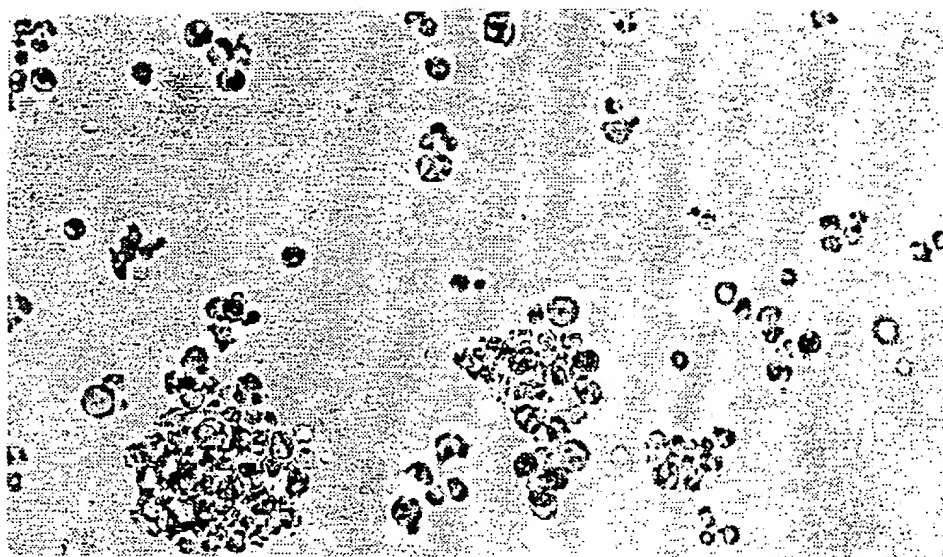


FIGURE 5 A

5/5/1

Coculture of H9/HIV-1 cells with Murine T cells/Hu-CD4

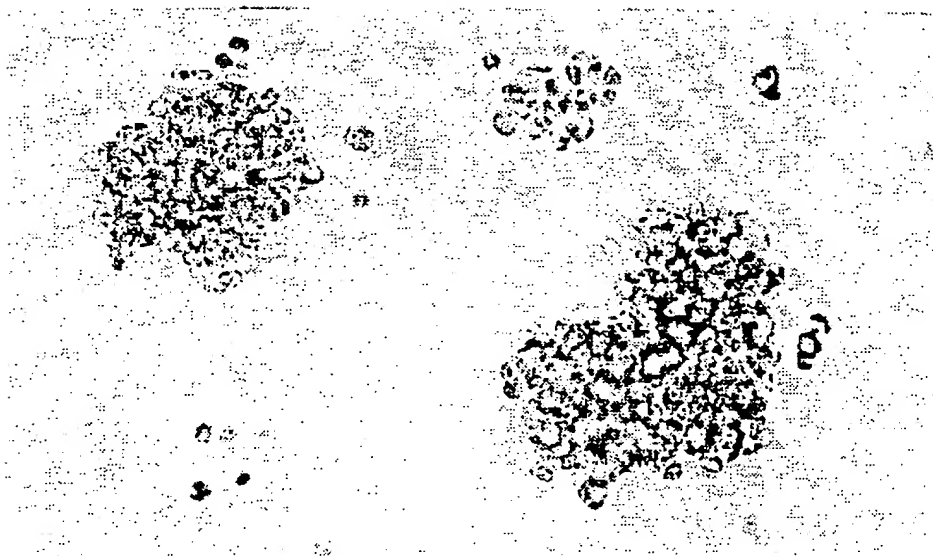


FIGURE 5 B



5/5/2

Coculture of H9/HIV-1 cells with Murine  
T cells/HU-CD4/Hu-CD26

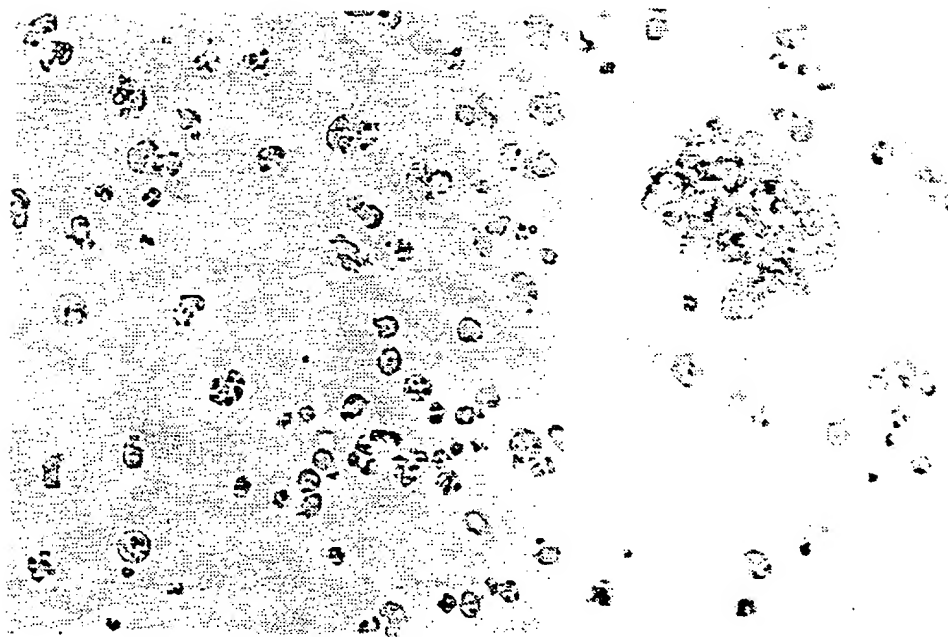


FIGURE 5 C

5/5/3

Coculture of H9/HIV-1 cells with Murine  
T cells/HU-CD4/Hu-CD26

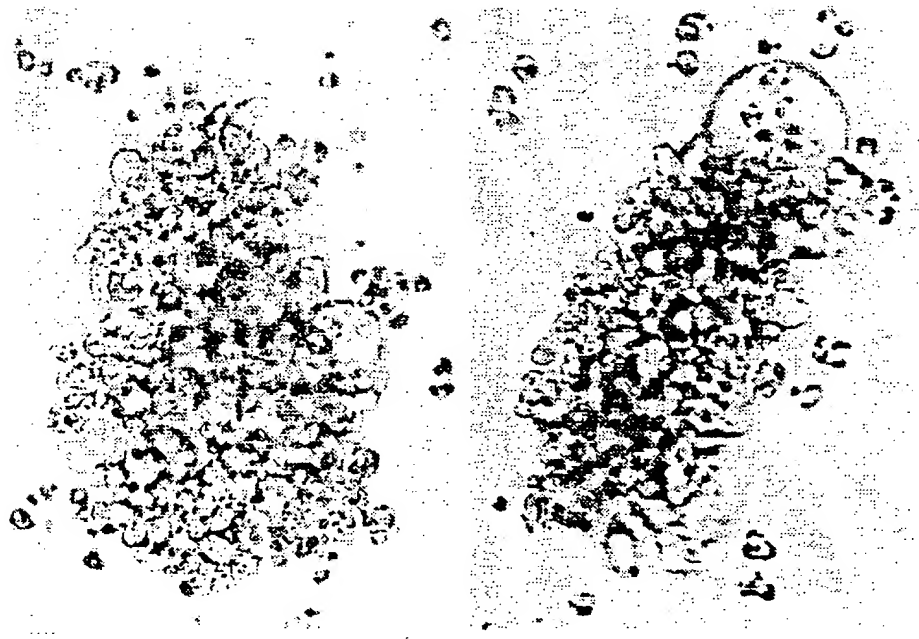


FIGURE 5 D

DERNIERE FEUILLE AJOUTEE

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No  
PCT/FR 94/00662

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 A61K37/02 A61K39/395 A61K39/42 A61K39/21 A61K37/52  
 A61K47/48 G01N33/569 C12N5/10 A01K67/027 /  
 /(A61K39/395,39:42), (A61K39/395,39:21)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K G01N C12N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9318, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-152050 & US,A,7 923 337 (US DEPT. HEALTH & HUMAN SERVICE) 1 April 1993	1,4,5,9, 10, 18-21, 26,30, 31,35,44
Y	see abstract ---	11-17, 22,23, 32-34,36
Y	IMMUNOBIOLOGY vol. 183, no. 3/4, October 1991, STUTTGART, ALLEMAGNE page 240 T. MATTERN ET AL. 'CD26 expression in HIV patients.' *abstract J.12* ---	11-13,17
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 'E' earlier document but published on or after the international filing date  
 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 1994

Date of mailing of the international search report

13-10-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .national Application No  
PCT/FR 94/00662

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA vol. 85, no. 15 , August 1988 , WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 5409 - 5413 J. TAM 'Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system.' cited in the application see abstract</p> <p>---</p>	22,23,36
Y	<p>WO,A,93 04693 (REPLIGEN CORPORATION) 18 March 1993 see claims</p> <p>---</p>	14,34
Y	<p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA vol. 1076, no. 2 , 29 January 1991 , AMSTERDAM, PAYS-BAS pages 314 - 316 J. RAHFELD ET AL. 'Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV?' see abstract</p> <p>---</p>	15,16,33
Y	<p>MOLECULAR IMMUNOLOGY vol. 29, no. 2 , February 1992 , OXFORD, GRANDE BRETAGNE pages 183 - 192 Y. TORIMOTO ET AL. 'Biochemical characterization of CD26 (dipeptidyl peptidase IV): Functional comparison of distinct epitopes recognized by various anti-CD26 monoclonal antibodies.' see abstract</p> <p>---</p>	32
A	<p>CARBOHYDRATE RESEARCH vol. 213 , 25 June 1991 , AMSTERDAM, PAYS-BAS pages 79 - 93 L. GATTEGNO ET AL. 'N-Acetyl-beta-D-glucosaminyl-binding properties of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1.' see page 80, line 34 - line 43</p> <p>---</p>	14
A	<p>WO,A,92 05800 (SYNTELLO VACCINE DEVELOPMENT KB) 16 April 1992</p> <p>see table 2 see claims</p> <p>---</p> <p>---/---</p>	1,5,9, 10,15, 16,18, 19,26, 30,33, 35,44

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .national Application No  
PCT/FR 94/00662

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS vol. 185, no. 2 , 15 June 1992 , ORLANDO FL, ÉTATS-UNIS pages 776 - 784 T. FUJIWARA ET AL. 'Selective cell-surface expression of dipeptidyl peptidase IV with mutations at the active site sequence.' see abstract</p> <p>---</p>	11-13,30
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA vol. 85, no. 12 , June 1988 , WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 4478 - 4482 J. GOUDSMIT ET AL. 'Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees.' cited in the application see abstract see figure 6</p> <p>---</p>	15,16, 18,19, 26,30, 35,44
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA vol. 82, no. 13 , July 1985 , WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 4438 - 4442 R. BRINSTER ET AL. 'Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs.' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	37-43
A	<p>WO,A,91 04327 (TSI-MASON RESEARCH INSTITUTE) 4 April 1991 see claims</p> <p>-----</p>	37-43

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00662

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
SEE ANNEX
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00662

Remark: Although Claims 2 and 3 (both in full), 1, 4-26, 32, 33 (all in part insofar as they relate to an *in vivo* method) are related to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product/composition.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No  
PCT/FR 94/00662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9304693	18-03-93	NONE	
WO-A-9205800	16-04-92	AU-B- 650911	07-07-94
		AU-A- 8643591	28-04-92
		CA-A- 2091263	28-03-92
		EP-A- 0550599	14-07-93
		JP-T- 6501260	10-02-94
WO-A-9104327	04-04-91	EP-A- 0489868	17-06-92
		JP-T- 5505096	05-08-93



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le internationale No  
PCT/FR 94/00662

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 5 A61K37/02 A61K39/395 A61K39/42 A61K39/21 A61K37/52  
 A61K47/48 G01N33/569 C12N5/10 A01K67/027 /  
 /(A61K39/395, 39:42), (A61K39/395, 39:21)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 A61K G01N C12N A01K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9318, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-152050 & US,A,7 923 337 (US DEPT. HEALTH & HUMAN SERVICE) 1 Avril 1993	1,4,5,9, 10, 18-21, 26,30, 31,35,44
Y	voir abrégé ---	11-17, 22,23, 32-34,36
Y	IMMUNOBIOLOGY vol. 183, no. 3/4, Octobre 1991, STUTTGART, ALLEMAGNE page 240 T. MATTERN ET AL. 'CD26 expression in HIV patients.' * abrégé J.12 * ---	11-13,17
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 Septembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

113 -10- 1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA vol. 85, no. 15 , Août 1988 , WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 5409 - 5413 J. TAM 'Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system.' cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	22,23,36
Y	<p>WO,A,93 04693 (REPLIGEN CORPORATION) 18 Mars 1993 voir revendications</p> <p>---</p>	14,34
Y	<p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA vol. 1076, no. 2 , 29 Janvier 1991 , AMSTERDAM, PAYS-BAS pages 314 - 316 J. RAHFELD ET AL. 'Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV?' voir abrégé</p> <p>---</p>	15,16,33
Y	<p>MOLECULAR IMMUNOLOGY vol. 29, no. 2 , Février 1992 , OXFORD, GRANDE BRETAGNE pages 183 - 192 Y. TORIMOTO ET AL. 'Biochemical characterization of CD26 (dipeptidyl peptidase IV): Functional comparison of distinct epitopes recognized by various anti-CD26 monoclonal antibodies.' voir abrégé</p> <p>---</p>	32
A	<p>CARBOHYDRATE RESEARCH vol. 213 , 25 Juin 1991 , AMSTERDAM, PAYS-BAS pages 79 - 93 L. GATTEGNO ET AL. 'N-Acetyl-beta-D-glucosaminyl-binding properties of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1.' voir page 80, ligne 34 - ligne 43</p> <p>---</p>	14
A	<p>WO,A,92 05800 (SYNTELLO VACCINE DEVELOPMENT KB) 16 Avril 1992</p> <p>voir tableau 2 voir revendications</p> <p>---</p>	1,5,9, 10,15, 16,18, 19,26, 30,33, 35,44
	---	-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS vol. 185, no. 2 , 15 Juin 1992 , ORLANDO FL, ÉTATS-UNIS pages 776 - 784 T. FUJIWARA ET AL. 'Selective cell-surface expression of dipeptidyl peptidase IV with mutations at the active site sequence.' voir abrégé</p> <p>---</p>	11-13,30
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA vol. 85, no. 12 , Juin 1988 , WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 4478 - 4482 J. GOUDSMIT ET AL. 'Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees.' cité dans la demande voir abrégé voir figure 6</p> <p>---</p>	15,16, 18,19, 26,30, 35,44
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA vol. 82, no. 13 , Juillet 1985 , WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 4438 - 4442 R. BRINSTER ET AL. 'Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs.' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	37-43
A	<p>WO,A,91 04327 (TSI-MASON RESEARCH INSTITUTE) 4 Avril 1991 voir revendications</p> <p>-----</p>	37-43

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 94/00662

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Voir annexe.
2. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR PCT/ISA/210

Remarque : Bien que les revendications 2 et 3 (toutes deux complètement), 1, 4-26, 32, 33 (toutes partiellement, pour autant qu'elles concernent une méthode in vivo), concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D. de Internationale No

PCT/FR 94/00662

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-9304693	18-03-93	AUCUN	
WO-A-9205800	16-04-92	AU-B- 650911	07-07-94
		AU-A- 8643591	28-04-92
		CA-A- 2091263	28-03-92
		EP-A- 0550599	14-07-93
		JP-T- 6501260	10-02-94
WO-A-9104327	04-04-91	EP-A- 0489868	17-06-92
		JP-T- 5505096	05-08-93

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010134849 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1995-036100/\*199505\*

XRAM Acc No: C95-016146

XRPX Acc No: N95-028503

New cpds. inhibiting entry of HIV into target cells - by modifying interaction between CD26 receptor and envelope glycoprotein, also new cells and transgenic animals for screening such cpds., useful in vaccines and treatment

Patent Assignee: INST PASTEUR (INSP )

Inventor: CALLEBAUT C; HOVANESSIAN A; JACOTOT E; KRUST B; MARIE I

Number of Countries: 022 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
<b>WO 9428915</b>	A1	19941222	WO 94FR662	A	19940603	199505 B
FR 2707169	A1	19950113	FR 936744	A	19930604	199508
FR 2707170	A1	19950113	FR 9312656	A	19931022	199508
AU 9510301	A	19950103	AU 9510301	A	19940603	199521

Priority Applications (No Type Date): FR 936744 A 19930604; FR 9312656 A 19931022

Cited Patents: 09Jnl.Ref; US 7923337; WO 9104327; WO 9205800; WO 9304693

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9428915 A1 F 85 A61K-037/02

Designated States (National): AU CA JP KR NZ US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

AU 9510301 A A61K-037/02 Based on patent WO 9428915

FR 2707169 A1 A61K-039/395

FR 2707170 A1 A61K-039/395

Abstract (Basic): WO 9428915 A

A cpd. (I) able to modify interaction between (a) a CD26-type receptor and the surface of cells in a patient infected with HIV and (b) the envelope glycoprotein of HIV is used to inhibit entry of HIV (partic. HIV-1 or -2) particles into target cells of an infected individual. Also new are: (1) in vitro screening of (I) comprising (a) contacting CD26 cells with one TCID50 of HIV or simian immune deficiency virus (SIV); (b) incubating at 37deg.C for long enough to allow viral penetration, in presence of test cpd.; (c) washing cells to remove virus absorbed on them; (d) sepg. extracellular virus and quantification of intracellular virus; (e) centrifuging to separate retroviral particles and recover supernatant, and (f) detection of HIV

proteins; (2) similar test for screening cpds. (Ia) able to modify catalytic activity of CD26; (3) cpds. (II) able to inhibit in vivo infection by HIV by modifying/inhibiting CD26-viral glycoprotein interaction; (4) recombinant cells able to express both human CD4 and CD26 receptors; and (5) transgenic animals contg. such cells.

USE - (I) and (II) are useful in vaccines to prevent HIV and SIV infections; also to treat existing infections. They inhibit formation of syncytia and induction of cellular apoptosis, and may be used in conjunction with other anti-HIV agents. The recombinant cells and transgenic animals are used in screening tests for (I). CD26 is a co-receptor for HIV and binds to the V3 loop or to other glycoproteins, and this binding is essential for penetration of HIV into CD4 T cells.

Dwg.0/5

Title Terms: NEW; COMPOUND; INHIBIT; ENTER; HIV; TARGET; CELL; MODIFIED; INTERACT; RECEPTOR; ENVELOPE; GLYCO; PROTEIN; NEW; CELL; TRANSGENIC;

ANIMAL; SCREEN; COMPOUND; USEFUL; VACCINE; TREAT

Derwent Class: B04; D16; P14; S03

International Patent Class (Main): A61K-037/02; A61K-039/395

International Patent Class (Additional): A01K-067/027; A61K-037/52;

A61K-038/04; A61K-038/17; A61K-039/21; A61K-039/42; A61K-047/48;

C07K-005/04; C07K-007/00; C07K-014/47; C12N-005/10; C12P-021/08;

G01N-033/53; G01N-033/569; A61K-039/395; A61K-039-42; A61K-039-21

File Segment: CPI; EPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F0200E; B04-F11; B04-G08; B04-K01U; B04-N03;

B04-N06; B04-P01A0E; B11-C07A; B11-C08E2; B12-K04A4; B14-A02B1; B14-S11;

D05-H07; D05-H09; D05-H14B2; D05-H16A

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M421 M423 M710 M750 M903 N102 N135 N136 P210 P831 Q233 V273 V279

V600 V611 V644 V754 V902 V911 V917 V921

Chemical Fragment Codes (M2):

\*02\* F011 F012 F423 H1 H100 H181 H2 H211 J0 J013 J1 J171 J3 J311 J371

M280 M315 M322 M333 M340 M342 M349 M381 M392 M413 M510 M521 M530

M540 M710 M750 M800 M903 M904 N102 P210 P831 Q233 V902 V911 V921

9505-31501-A 9505-31501-N

\*03\* F011 F012 F423 H1 H100 H101 H182 H2 H211 J0 J013 J1 J171 J3 J311

J371 K0 L2 L250 M280 M314 M315 M321 M332 M343 M349 M381 M392 M413

M510 M521 M530 M540 M710 M750 M800 M903 M904 N102 P210 P831 Q233

V902 V911 V921 9505-31502-A 9505-31502-N

Chemical Fragment Codes (M6):

\*04\* M903 P210 P831 Q233 R515 R520 R521 R622 R630 R631 R637

Generic Compound Numbers: 9505-31501-A; 9505-31501-N; 9505-31502-A;

9505-31502-N



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**